

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kelli Grand

Loote DNA sekveneerimine – uus ajastu sünnieelses diagnostikas

Bakalaureusetöö

Juhendaja Lili Milani, Ph.D

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1 KAASASÜNDINUD HAIGUSED	5
1.1 KROMOSOOMI ARVU MUUTUS	5
1.2 KROMOSOOMI STRUKTUURNE MUUTUS.....	6
1.3 MONOGENEENSED HAIGUSED	7
2 SÜNNIEELNE DIAGNOSTIKA.....	8
2.1 MITTEINVASIIVSED MEETODID.....	8
2.1.1 Ultraheliuuring.....	8
2.1.2 Vereseerumi skriining.....	8
2.2 INVASIIVSED MEETODID	10
2.2.1 Invasiivne proovi võtmine.....	10
2.2.2 Loote kromosoomianalüüs.....	10
3 NUKLEIINHAPPED (DNA, RNA) PERIFEERSES VERERINGES.....	12
3.1 LOOTE DNA EMA VERES	13
3.2 VERES RINGLEVATE NUKLEIINHAPETE LAGUNEMINE JA SELLE KIIRUS	15
4 MITTEINVASIINE LOOTE DNA SÜNNIEELNE TESTIMINE	17
4.1 CFFDNA ERAHDAMINE NING KASUTUSALAD	17
4.2 CFFDNA NING TEISE PÕLVKONNA SEKVENEERIMINE	19
4.2.1 Kogu rakuvälise DNA sekveneerimine	21
4.2.2 Suunatud rakuvälise DNA sekveneerimine	22
4.3 KOMMERTSIAALSSED PRENATAALSSED TESTID	24
5 ARUTELU.....	25
KOKKUVÕTE	31
SUMMARY.....	32
TÄNUAVALDUSED.....	33
KASUTATUD KIRJANDUS.....	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	41
LIHTLITSENTS	42

KASUTATUD LÜHENDID

AC – amniotsenees

AFP – alfa-fetoproteiin

ccfDNA – *circulating cell-free DNA*, tsirkuleeriv rakuvaba DNA

cffDNA – *cell-free fetal DNA*, rakuvaba loote DNA

cfpDNA – *cell-free placenta DNA*, rakuvaba platsenta DNA

CMA – *chromosomal microchip analysis*, mikrokiibi kromosoomanalüüs

CVS – *chorionic villus sampling*, koorionbiopsia

DANSR – *digital analysis of selected regions*, selekteeritud regioonide digitaalne analüüs

FISH – fluorestsents märgisega *in situ* hübridistatsioon

GC – guaniin-tsütosiin

hCG – inimese koorionigonadotropiin

NGS – *next generation sequencing*, teise põlvkonna sekveneerimine

NIPT – *non-invasive prenatal testing*, mitteinvasiivne sünnieelne diagnostika

NT – *nuchal transluceny*, loote kuklapiirkonna läbikumavus

PAPP-A – *pregnancy associated plasma protein-A*, rasedusega seotud plasma proteiin-A

SNP – *single nucleotide polymorfism*, ühenukleotiidne polümorfism

uE3 – konjugeerimata östriool

UH – ultraheliuuring

β-hCG – beeta-kooriongonadotropiin

SISSEJUHATUS

Sünnieelne diagnostika on läbimas murdelist ajapunkti. Molekulaarse tehnoloogia ning diagnostika areng dikteerib sünnieelse info kvaliteedi tõusu ning uute meetmete kasutusele võttu. Senine sünnieelne diagnostika pakub rasedatele vereseerumi biokeemiliste markerite kontrolli koos ultraheliskriinimisega. Kõrge riskiga rasedatele pakutakse võimalust invasiivse testiga määrata loote karüotüüp. Invasiivselt loote rakkude emaüsast võtmine võib ohustada normaalset raseduse kulgu ning põhjustada iseeneslikku aborti. Uuem sünnieelne testimine keskendub ohutule testimisele mitteinvasiivsetel meetoditel.

Juba rohkem kui 70 aasta tagasi uurisid Mandel ja Metais rakuväliste nukleiinhapete leidumist nii tervete kui haigete indiviidide vereplasmas. Tol ajal nende töö märkimisväärset kajastamist ei saanud, kuni 1970-ndate aastateni, mil tuvastati suurenenud rakuvaba DNA kontsentratsiooni vähihaigete veres. Avastus pani teadlasi uurima ka loote DNA olemasolu võimalikkusele ema vereringes, mis sai kinnitust möödunud sajandi lõpus. Rakuvälise loote DNA avastamine rasedate veres on andnud tõuke täiesti uutele mitteinvasiivsetele sünnieelse testimise meetoditele.

Loote genoomi aneuploidsus ehk kromosoomi arvu muutus on kõige sagedasem sünnieelne haiguse ja raseduse katkemise põhjus. Kromosoomide arvu muutusi lootes põhjustavad sageli ebakorrapärased meioosi rakujagunemised, mis on väga tihedalt seotud raseda kõrge bioloogilise vanusega (>35). Eestis on viimase 20 aastaga toimunud märgatav tõus esimest last kandvate rasedate vanuses ning ilmselt jätkab see number tõusujoones. Sünnieelne diagnostika on suunatud suuresti loote kromosomaalsete arvu muutuste prenataalsele määramisele.

Rakuvälist loote DNA-d esineb ema vereringes keskmiselt 10 % kogu rakuvaba DNA-st, mis vajab seetõttu analüüsiks tundlikku tehnoloogiat. Rakuvälise loote DNA analüüs teise põlvkonna sekveneerimisega on näidanud täpseid tulemusi loote aneuploidsuse määramisel. Samal meetodil on näidatud ka subkromosomaalsete genoomi muutuste, monogeensete haiguste ning rasedusega seotud komplikatsioonide detekteerimise võimalikkust. Teiselt poolt on loote genoomi sekveneerimine tehniliselt keeruline, kallid ning tõstatab mitmeid eetilisi küsimusi.

Käesoleva referatiivse bakalaureusetöö eesmärgiks on anda ülevaade kliinilises praktikas kasutusel olevast sünnieelsest diagnostikast ning selle meetoditest. Põhjalikumalt käsitletakse uuemate mitteinvasiivsete DNA testide võimalusi, eeliseid ja puuduseid.

1 KAASASÜNDINUD HAIGUSED

Kaasasündinud haigused eksisteerivad juba sündides, avaldudes tihti enne sündi või arenevad välja esimeste elukuude jooksul. Kaasasündinud haiguse tekke põhjus võib olla geneetiline ehk genoomis toimunud muutuste tagajärg. Kromosoomi struktuuri, arvu, suuruse või selle mingi piirkonna mutatsioonid võivad põhjustada loote väärarenguid, raseduse tüsistusi, erinevaid loote- ning lapsea haiguseid, intellektuaalset mahajäämust, arenguhäired jne. Sellised kromosomaalsed muutused on seotud probleemidega vanemate sugurakkude mitootilises või meiotilises lahknemises, mille tekketõenäosus suureneb ema vanuse tõusuga (Allen jt., 2009).

1.1 Kromosoomi arvu muutus

Aneuploidsuseks nimetatakse organismi üksikkromosoomi või suurema kromosoomlõigu arvu kordsust või puudumist. Sellise genotüübilise muutusega kaasnevad fenotüübiliste tunnuste suured muutused nagu näiteks vaimne mahajäämus. Kui genoomis toimub ühe kindla kromosoomi arvu muutus, on tegemist trisoomia või monosoomiaga.

Trisoomia korral on genoomis üks lisa kromosoom. Sagedamini esinev näide on Downi sündroom, kus on toimunud 21. kromosoomi arvu muutus – kokku on Downi sündroomiga indiviidil kolm 21. kromosoomi koopiat kahe asemel. Selline genoomi muutus põhjustab fenotüübis sündroomile iseloomulikke näojooni ning intellektuaalset mahajäämust. Keskmiselt 30 % Downi sündroomiga rasedustest katkeb, kuid enamik sündinud indiviidid elavad kuni 60-ndate eluaastateni (Petersen ja Mikkelsen, 2000).

Edwardsi sündroom ehk 18. kromosoomi trisoomia on teine kõige sagedamini esinev autosomaalne trisoomia, põhjustades intellektipuet ning mitmete siseorganite väärarenguid. Ainult 10% sündinutest elavad kauem kui üks eluaasta (Petek jt., 2003; Wu jt., 2013).

Kromosoom 13 trisoomia ehk Patau sündroom on seotud raske intellektuaalse puude ning anatoomiliste väärarengutega. Samuti kannatavad patsiendid mitmete raskeloomuliste terviseprobleemide (südamepuudulikkus, hüpotoonia, aju- või seljaaju probleemid jpt) all, ning sarnaselt Edwardsi sündroomile surevad rohkem kui 80 % patsientidest esimese eluaasta jooksul (Wu jt., 2013).

X-sugukromosoomi trisoomia põhjustab Klinefelteri sündroomi (47, XXY), mis mõjutab meeste füüsilist ja kognitiivset arengut ning viljakust. X-kromosoomi arvu kordsus on väga sagedaselt esinev trisoomia, mis võib avalduda kergete sümptomitega ning jääb tihti diagnoosimata (Boada jt., 2009). Turneri sündroom, mille korral puudub osaliselt või

täielikult üks sugukromosoomist (45, X), mõjutab naiste munasarjade arengut ning põhjustab viljatust (Bondy ja Turner Syndrome Study Group, 2007).

Tabel 1. Sagedaste aneuploidsete sündroomide esinemissagedused elussündinud laste kohta (peatükis leiduvate viidete põhjal). 2013. aastal viidi Eestis läbi 879 invasiivset protseduuri, kromosoomanomaalia leiti 63 lootel (seal hulgas tabelis puuduvad genoomi muutused nagu triploidsus, struktuursed aberratsioonid, translokatsioonid jms).

Sündroom	Esinemissagedus	2013. aastal leitud kromosoomanomaaliad
Downi sündroom	1:1000	27:879
Edwardsi sündroom	1:3000	7:879
Patau sündroom	1:5000	5:879
Klinefelteri sündroom	1:650 (meestel)	2:879
Turneri sündroom	1:2500 (naistel)	1:879

Kromosoomi arvuline muutus on inimestel kõige sagedasemalt esinev genoomi mutatsioon: 5 %-l kõigist kliiniliselt jälgitud rasedustest esineb trisoomia või monosoomia (Hassold ja Hunt, 2001). Varase raseduse iseenesliku katkemise tagajärel jäävad suurem osa loodete aneuploidsustest diagnoosimata (Menasha jt., 2005).

1.2 Kromosoomi struktuurne muutus

Kromosoomide struktuuris võivad tekkida muutused, kui mingi osa geneetilisest materjalist on katkenud ja ümberpaiknenud, mis on paljude kromosoomhaiguste põhjuseks. Kõige enam on intellektuaalset ning füüsilist arengu mahajäämust põhjustavad haigused seotud kromosoomi teatud regiooni deletsiooni või duplikatsiooniga, näiteks Prader-Willi ja Angelmani sündroomid (15q11-q13 deletsioon), mis esinevad 1:15 000-25 000 elussünni kohta (Buiting, 2010). Analoogete näiteid võib tuua mitmekümneid.

Muutused struktuuris võivad olla varieeruva pikkusega, tihtipeale väga lühikesed ning raskesti märgatavad. Selliste muutuste mõju organismi elutegevusele oleneb, kus ja kui suur regioon genoomist on muutunud või ümberpaiknenud.

1.3 Monogeneensed haigused

Monogeneensed haigused avalduvad ühe või mõlema vanema defektse geenialleeli pärandumisel. Sellised haigused võivad olla retsessiivsed, kus avaldumise eelduseks on mutatsiooniga geeni pärandumine mõlemalt vanemalt, või dominantset, kus haiguse avaldumiseks piisab ühest defektsest alleelist.

Tabel 2. Sageli esinevate monogeensete haiguste sagedused (elussündide kohta) ning sümptomid üldpopulatsioonis.

Haigus	Sagedus	Sümptomid	Viide
β-talasseemia	1:10 000	aneemia	(Galanello ja Origa, 2010)
Hemofiilia	1:5000 (meestel)	verejooks liigestesse ja lihastesse	(Graw jt., 2005)
Tsüstiline fibroos	1:2500	hingamis- ja/või seedesüsteemide kahjustused	(Gershman jt., 2006)
Fragiilse X-i sündroom	1:2500 (naistel), 1:1250 (meestel)	sündroomile iseloomulik välimus ning vaimne mahajäämus	(Koukoui ja Chaudhuri, 2007)
Huntingtoni tõbi	1:34 000	käitumuslikud häired, kontrollimatud liigutused	(Sturrock ja Leavitt, 2010)

Haigusi põhjustavad geenid võivad paikneda nii autosomaalsetel kromosoomidel kui ka sugukromosoomidel.

2 SÜNNIEELNE DIAGNOSTIKA

Sünnieelse diagnostika eesmärk on varajaselt avastada ning võimalusel ennetada loote tervise- ning arenguprobleeme. Sünnieelsed uuringud saab jagada mitteinvasiivseteks, nagu näiteks ultraheliuuring ja rasedate vereseerumi sõeluuring, ning invasiivseteks, nagu näiteks amniotsentees, koorionbiopsia, kordotsentees, embrüo biopsia.

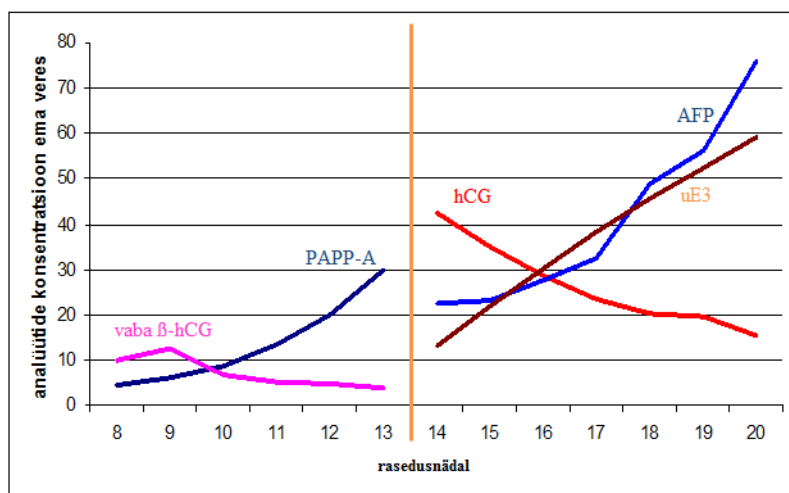
2.1 *Mitteinvasiivsed meetodid*

2.1.1 Ultraheliuuring

Loote ultraheliuuringuga (UH) hinnatakse loote arengut (näiteks pea, südame ja selgroo suurused, organite olemasolu), võimalikke väärearendeid ning kromosoomihaiguste riski. Riski hindamiseks mõõdetakse I trimestril (11.-13. rasedusnädalal) kuklavoldi läbikumavust (NT), mille paksenemine võib viidata loote kromosoomihaigustele. II trimestri (19.-21. rasedusnädalal) uuringu eesmärgiks on loote väärearendite avastamine. UH on ohutu ja kiire meetod, mida enamasti kasutatakse paralleelselt mõne teise sünnieelse diagnostika meetodiga, näiteks markerite skriinimisega (allikas: Eesti Naistearstide Selts „Raseduse jälgimise juhend“, 2011).

2.1.2 Vereseerumi skriining

Markerite sõeluuring tähendab loote või platsenta poolt toodetud biomolekulide (valkude) kontsentratsiooni mõõtmist raseda verest. Esimesel trimestril on võimalik vereproovist analüüsida rasedusega seotud biomolekule nagu plasma proteiin PAPP-A ja vaba beeta-kooriongonadotropiin (β -hCG) (9.- 11. rasedusnädalal). Teisel trimestril on võimalik vereseerumist määrata rasedusega seotud ühendeid nagu α -fetoproteiini (AFP), hCG ning uE3 (Joonis 1).



Joonis 1. Ülevaade markerite kontsentratsioonist rasedusnädalate (esimese kahe trimestri) lõikes. (allikas: Ülevaade rasedate I trimestri kombineeritud sõeluuringust, TÕ Kliinikumi näitel. Ettekanne 6.12.2013).

Protseduuri tulemus ei anna haiguse diagnoosi, vaid uuritava markeri liiga madala või kõrge kontsentratsioon määrab võimalikku haiguse olemasolu riski (Tabel 3). Lisaks on oluline riski määramisel arvestada raseda vanuse ja kaalu, etnilise tausta ning muude rasedust puudutavate andmetega (suitsetamine, alkoholitarbimine jne) (allikas: Eesti Naistearstide Selts „Raseduse jälgimise juhend“, 2011).

Tabel 3. Vereseerumi skriinimisel kasutatavad biomolekulid ning nende seotus loote haiguste ning raseduse komplikatsioonidega.

Marker	Muutus veres	Seostatud tunnus
PAPP-A	↓	aneuploidsus
vaba β-hCG	↓/↑	raseduse katkemine/Downi sündroom
AFP	↑	neuraaltoru defekt
hCG	↑	raseduse katkemine
uE3	↓	Downi sündroom, hüoplaasia
Inhibiin A	↑	Downi sündroom

2.2 Invasiivsed meetodid

2.2.1 Invasiivne proovi võtmine

Amniotsentees ehk lootevee uuring (AC) on enimkasutatav meetod loote rakumaterjali saamiseks. Erinevad allikad viitavad varieeruvatele rasedusnädalatele, kuid kõige ohutum on protseduuri läbi viia alates 15. rasedusnädalast (RCOG, 2010). Loote rakud saadakse loodet ümbritsevast looteveest ehk amnionivedelikust. Lootevesi sisaldab muuhulgas ka loote naharakke ning rakke lootekoti seinalt, millest on võimalik kromosoomuuringuks eraldada loote geneetiline materjal.

Koorionibiopsia (CVS) korral võetakse arenema hakanud platsentast koorionhatu rakud. Protseduur viiakse läbi enamasti alates 11. Rasedusnädalast (RCOG, 2010). Lootest saadakse rakud biopsianõela abil läbi kõhu või kateedriga.

Mõlemad protseduurid tehakse ultraheli abil, et mitte vigastada loodet. Invasiivselt saadud rakud kasvatatakse spetsiaalses toitelahuses ning kultiveeritud rakke kasutatakse edasi kromosoomianalüüsiks.

Invasiivse meetodiga võib kaasneda raseduse katkemise oht - kuni ühel naisel AC protseduuri ning kahel naisel CVS protseduuriga 100-st võib toimuda iseeneslik abort (Tabor jt., 2009). CVS protseduuri läbinud rasedatel on raporteeritud väärarenguid loodete hilisemas jäsemete arengus (Firth jt., 1991).

2.2.2 Loote kromosoomianalüüs

Invasiivselt saadud loote geneetilist materjali on võimalik analüüsida mitmel meetodil. Üheks võimaluseks on uurida vöödistatud kromosoomide suuremaid (> 5Mb) arvu ja struktuuri muutuseid valgusmikroskoobi abil. Selleks tuleb kromosoomid eelnevalt värvida.

Lisaks on võimalik kasutada kindlate kromosoomi piirkondade analüüsiks fluorestsents märgisega *in situ* hübridistatsiooni (FISH) analüüsi, millega on võimalik detekteerida muutuseid alates 100 kb (Evans jt., 1999), kvantitatiivset fluorestsents PCR-i (Mann jt., 2012) ning multipleks ligeeritava genoomse amplifikatsiooni meetodit (Gerdes jt., 2008).

Kromosomaalne mikrokiibi analüüs (CMA) pakub võimaluse uurida kromosoomi arvu ning struktuuri muutuseid korraga ühel kiibil. Kliinilises praktikas kasutatakse kahte tüüpi mikrokiipe – võrdleva genoomse hübridisatsiooni ja ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP)

kiipe. Mõlema kiibi puhul seotakse uuritav DNA (näiteks loote DNA) kiibi pinnal olevate genoomi eri piirkondi esindavate järjestustega. Hübridisatsiooni kiibi puhul seotakse kiibile nii uuritav kui ka kontroll DNA, mõlemad värvitakse eelnevalt erinevate fluorestsentsvärvidega. Analüüsis võrreldakse kahe fluorestsentsvärvi intensiivsusi ning kontroll DNA intensiivsusest madalama või kõrgema signaaliga regioone seostatakse vastavalt deletsioonide ja duplikatsioonidega. SNP-i kiipidele seotakse ainult uuritav DNA ning kiibi pinnal olevate genoomi regioonide esindatuse intensiivsused registreeritakse genotüübi analüüsiks (Bianchi, 2012).

Mikrokiibid võivad kogu genoomi analüüsi asemel olla suunatud konkreetsete genoomi piirkondade või haigusseoseliste geenide analüüsiks. Selleks kinnitatakse eelnevalt kiibile ainult uuritavad genoomi regioonid.

Mikrokiibi analüüs on kiirem ja tundlikum kui eelnevalt kirjeldatud meetodid ning sellega on võimalik detekteerida lühikesi (50-100 kB) kromosoomi DNA ümberkorraldusi (Friedman, 2009). Samaaegselt saab analüüsida mitmeid haigusseoselisi genoomipiirkondasid. Tänu suuremale tundlikkusele on CMA efektiivsem meetod tavalisest karütüüpiseerimisest ja FISH meetoditest, määrates rohkem kromosomaalseid ebakorrapärasusi. Kiibianalüüsiga ei ole võimalik tuvastada tasakaalustatud translokatsioone ning triploide (Hillman jt., 2011; Wapner jt., 2012; Fiorentino jt., 2013).

3 NUKLEIINHAPPED (DNA, RNA) PERIFEERSES VERERINGES

Veres tsirkuleeriva rakuvälise DNA (ccfDNA) avastuseni jõudsid Mandel ja Metais juba 1948. aastal (Mandel ja Metais, 1948). ccfDNA-d võib leida nii tervete, rasedate kui ka haigete inimeste vereringest.

Suurem osa veres olevast DNA-st arvatakse pärinevat tuumaga vererakkudest. Mitoosi läbinud lümfotsüütide sünteesitud DNA-st arvestatav osa, 35-90 %, sekreteeritakse väliskeskkonda (Rogers jt., 1972) ning on verest detekteeritav. Peale lümfotsüütide on näidatud ka teiste elus rakkude DNA eraldamist, näiteks konna puhul tervete organite poolt spontaanne DNA sekreteerimine verre (Anker ja Stroun, 1997).

Mitmetes teaduslikes töodes on leitud, et vabalt ringleva kasvaja ccfDNA allikaks on kasvajarakkude hävinemine nekroosi (Stroun jt., 1987; Maebo, 1990; Fournie jt., 1995) või lüüsimise tulemusel. Viimasele hüpoteesile vähirakkude puhul on leida kirjandusest mitmeid vastuväiteid. Kasvajarakkude uurimisel on märgatud, et veres esinenud DNA hulk ei korreleeru potentsiaalsete rakuvaba DNA-doonor rakkude hulgaga veres (Sorenson jt., 1997; Chen jt., 1999).

Kõige loogilisemaks seletuseks geneetilise materjali sattumisele verre peetakse rakkude apoptoosi ehk programmeeritud surma (Fournie jt., 1995). Seda fakti toetab ka plasma ning seerumi ja apoptootilistest rakkudest pärit DNA sarnane muster elektrofooresil (Stroun jt., 1987; Fournie jt., 1995).

On näidatud, et veres ringlevat DNA-d leidub organismis piisavas koguses diagnostilisteks analüüsideks ning seda on võimalik detekteerida lisaks verele ka teistest kehavedelikest, näiteks uriinist (Botezatu jt., 2000).

Peale DNA leidumise on täheldatud rakuvaba RNA tsirkuleerimist veres. Mitmed uurimisrühmad raporteerisid möödunud sajandi vahetusel vähihaigete verest kasvajaspetsiifilise RNA leidu (Kopreski jt., 1999; Lo jt., 1999a; Chen jt., 2000). Poon jt. olid esimesed, kes uurisid lootelt pärit RNA leidumise võimalikkust rasedatel. Nende töö tulemused kinnitasid Y-kromosoomi spetsiifilise *ZFY* valku kodeeriva mRNA olemasolu ema vereringes (Poon jt., 2000). Kuna RNA on vastuvõtlikum degradatsioonile, siis suutistid nad varajases rasedusstaadiumis detekteerida verest mRNA 22% uuringus osalejatest. Hilises rasedusstaadiumis tõusis see arv 63%-ni. (Selline leid on sarnane loote DNA taseme tõusuga raseduse kulgemisel.ei ole veel sellest rääkinud..) RNA analüüsil on suurem bioloogiline tähtsus andes informatsiooni loote geeniekspressiooni tasemetest. Loote DNA uurimisel tuleb arvesada, et see on vanemate poolt päritud järjestused. RNA aga võib olla täiesti lootespetsiifiliseks markeriks.

Kasvajapatsientide rakuvälise nukleiinhapete uuringutest ajendatult on viimase kahe aastakümne jooksul viidud läbi mitmeid teadustöösid seoses rasedate veres loote geneetilise materjali olemasolu ning võimalike kasutusvalade analüüsimisega.

3.1 *Loote DNA ema veres*

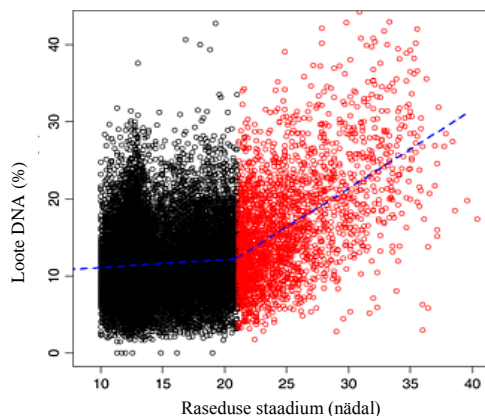
Loote ning ema vaheliste rakkude liikumiste tõestamine viitas loote DNA võimalikule olemasolule (Lo jt., 1996). Kõige esimene katse detekteerida emaverest loote DNA-d tehti samas uurimisrühmas määrates XY karüotüübiga looteid (Lo jt., 1997).

Kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) amplifitseeriti ema verest puhastatud DNA-l Y-kromosoomil asuv *SRY* geen ning tulemused analüüsiti agarose geleelektroforeesil. Kõigi loodete sugu määrati õigesti.

Rakuvaba loote DNA (cffDNA) kogused ema perifeerses vereringes on varieeruvad. Kogu vereplasmast leitava DNA kontsentratsioon terve ja mitte raseda täiskasvanud indiviidi korral on vahemikus 10^3 - 10^4 koopiat milliliitri kohta ehk genoomi-ekvivalenti/ml (Wu jt., 2002).

Raseduse korral tõuseb nii ema rakuvälise DNA kogus kui lisandub ka loote DNA ema verre (Lo jt., 1998). Lo jt analüüsisid reaal-aja PCR-iga nukleiinhapete kontsentratsioone raseda veres. Loodete *SRY* geeni kontsentratsiooni määrates said nad loote DNA osahulgaks varases raseduses 3,4 % ning hilises 6,2 % kogu rakuvälises DNA-s. cffDNA osahulga suurus veres on oluline, liiga väheste DNA korral ei ole diagnoosimine täpne. Kõige enam mõjutab loote DNA osahulka veres ema kehakaal (Ashoor jt., 2013), kõrgema kehamassiindeksiga rasedatel on loote DNA osahulk väiksem.

Lisaks raporteeris uurimisrühm oma töös, et loote DNA kontsentratsioon tõuseb kuni 12 korda raseduse lõpuks. Väidet on kinnitanud hilisemad uurimustööd, lisades, et eriti suurt rakuvaba loote DNA kontsentratsiooni tõusu (2 % nädalas) on näha raseduse viimasel kaheksal nädalal (Joonis 2) (Wang jt., 2013). Kõige varasemalt on näidatud loote DNA olemasolu veres juba 4. rasedusnädalal (Illanes jt., 2007).



Joonis 2. Loot DNA osahulk ema perifeerses veres rasedusnädalate lõikes. Uuringus osales 22 384 rasedat alates 10. rasedusnädalast. Sinise joonega on näidatud loot DNA osahulga keskmist kasvu, mis esimesel perioodil (mustad ringid) oli 0,1 % ning hilisemal perioodil (punased ringid) 1 % nädalas (Wang jt., 2013).

Kogu rakuvaba loot DNA päritolu on teadmata, kuid suur hulk sellest pärineb apoptootilistest platsenta rakkudest. Igapäevaselt jagunevad miljonid rakud inimese kehas ning kudede homöostaasi säilitamiseks sama suur hulk rakke ka hävitatakse. Raku surma üks loomulikest osadest on DNA fragmentatsioon. Ringluse käigus peaks igapäevaselt organismis degradeerima kuni 10 grammi fragmenteeritud DNA-d. Selliste koguste juures jääb osa DNA-st lõplikult degradeerimisest välja ning seega on verest detekteeritav (Rudin ja Thompson, 1997). *Ohashi* jt. näitasid oma uurimustöös loot DNA ning platsenta trofoblastide poolt produtseeritud koorioni gonadotropiini (hCG) kontsentratsioonide korreleerumist. Verest määrati *SRY* geenide ja hCG-i kontsentratsioonid 63 rasedal, tulemuseks saadi vastavalt 37,3 koopiat/ml ning 29,0 IU/ml (*Ohashi* jt., 2002). Tulemustest järelitati, et enamik ema veres olevast loot DNA-st pärineb platsentast (*Bianchi*, 2004).

Seost loot DNA ning apoptootiliste rakkude vahel kinnitab veel plasmas leiduv nukleiinhapete pikkus. Ema rakkudest tulnud DNA lõigud on märgatavalt pikemad veres ringlevatest loot DNA fragmentidest, mis on umbes 200 aluspaari pikad (kuid mitte üle 313 bp). Sarnase pikkusega fragmendid tekivad ka apoptootiliste protsesside tulemusel, mis tõendab apoptoosi rolli rakuvaba DNA tekkes (*Chan* jt., 2004).

DNA analüüsimeetoditeks on vaja, et loot DNA osahulk ema veres oleks vähemalt 3-4 %. Analüüsiks arvestatavas koguses rakuvaba DNA leiduvus veres paneb juurdlema võimaliku stabiliseerimismehhanismi üle. *Halicka* uurimisrühm iseloomustas apoptootiliste kehade teket ning märkis ära, et apoptootilised kehad sisaldavad tavaliselt ka nukleiinhappeid

- kas DNA-d või RNA-d. Seega ringleb veres leitav DNA suure tõenäosusega kompleksis valkudega, kaitstuna apoptootilises kehakeses või nukleosoomis (Halicka jt., 2000).

Varieeruv kontsentratsioon nukleiinhappeid ringleb veres kõigil rasedatel, kuid tavaliselt suurem loote rakuvälise DNA kogus veres võib viidata rasedusega seotud komplikatsioonidele. Preeklampsia on kõige enam uuritud rasedustüsistus, mis esineb kuni 10 %-l rasedatest (World Health Organization, 2011), ning võib põhjustada erinevaid komplikatsioone nii lootele kui rasedale. Preeklampsia tekkepõhjused on ebaselged, kuid haigus avaldub raseda organismis vererõhutõusuga, mille käigus oksüdatiivne stress viib trofoblastid apoptoosini. Platsenta morfoloogia on tihedalt seotud verest leitava loote DNA-ga ning platsenta muutused on nähtavad cffDNA kaudu. Mitmed uurimisrühmad on märganud preeklampiaga kaasnevat cffDNA (ja ka ema rakuvaba DNA) koguse tõusu ema veres (Lo jt., 1999c; Zhong jt., 2001).

Selget loote DNA kontsentratsiooni tõusu veres on raporteeritud veel enneaegse sünnituse (Leung jt., 1998), loote aneuploiduse (Lo jt., 1999b), polühüdramnionia ehk looteveeliigsuse (Zhong jt., 2000) ja *hyperemesis gravidarum* ehk ägeda rasedusaegse iivelduse (Sekizawa jt., 2001) korral.

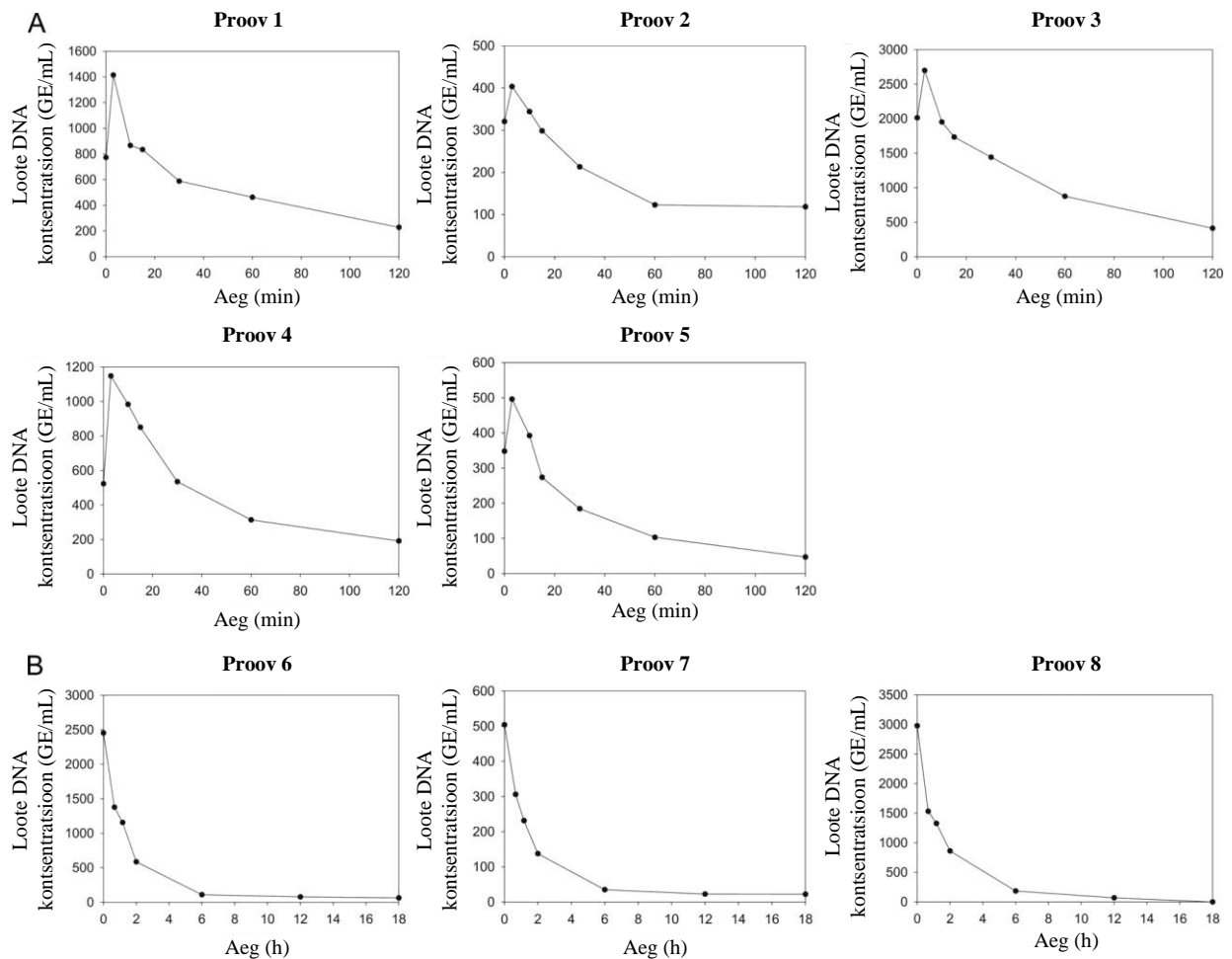
cffDNA annab võimaluse jälgida ema ja loote tervist kogu raseduse vältel. Veres leitav loote DNA pärineb geenidest üle terve loote genoomi ning loote ebanormaalsused ja platsenta patoloogiad kajastuvad kõik vähemal või suuremal määral ema veres.

3.2 Veres ringlevate nukleiinhapete lagunemine ja selle kiirus

Tsirkuleeriva loote DNA eluea pikkuse suhtes võib kirjandusest leida vastukäivad väiteid. Lo jt. uurisid PCR-i abil kaheksat sünnitajat viiel ajahetkel (5, 15, 30, 45 ning 60 minutit) pärast keisrilõiget. Seitsmel naisel kaheksast ei olnud kahe tunni möödudes loote DNA-d enam võimalik verest detekteerida (Lo jt., 1999b). Sama uurimisrühm analüüsis DNA elimineerimise kiirust 2013. aastal kasutades tundlikumat tehnoloogiat. Tulemused kinnitasid, et loote DNA degradeeriti raseda veres täielikult alles 1-2 päeva pärast sünnitust (Joonis 3) (Yu jt., 2013).

Lisaks DNA lagunemisega seotud kontsentratsiooni muutustele ajas uuriti ka võimalikku DNA suurusjaotuse varieeruvust. Märkimisväärseid kõrvalekaldeid nad ei leidnud. Seega peale veres leiduvate nukleaaaside elimineerib nukleiinhappeid alternatiivne mehhanism. Maks ja neerud on ühed peamised organid, mis vastutavad organismi puhastamise eest. Vererõhu tõusmisel (näiteks preeklampsia korral) võivad raseda maks ja neerud kahjustada saada. Varem juba täheldatud DNA kontsentratsiooni tõus preeklampsia

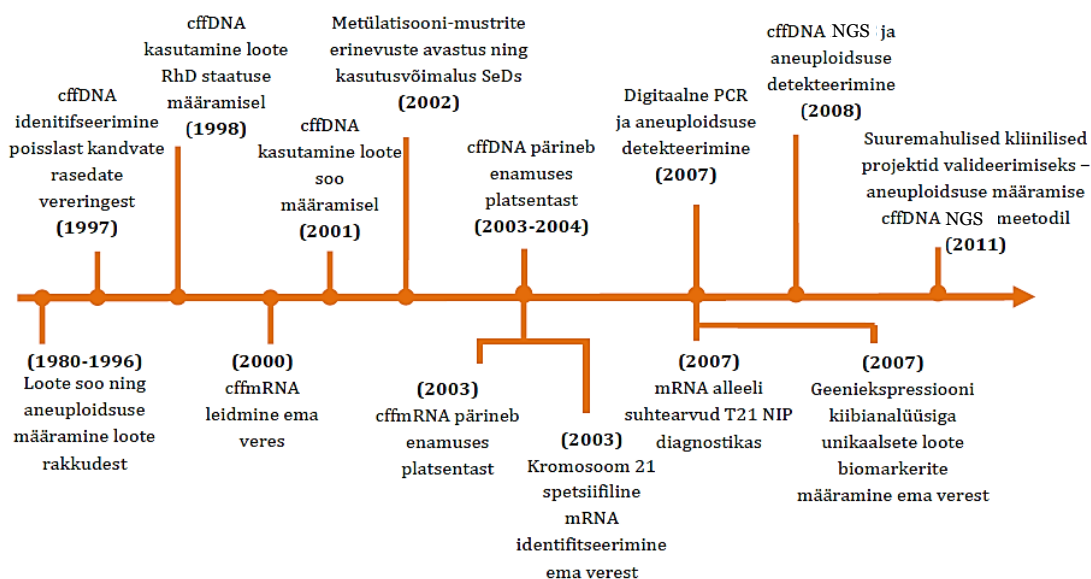
korral viitab, et antud organid vastutavad mingil määral veres leiduva DNA elimineerimisest (Yu jt., 2013).



Joonis 3. Kaheksa sünnitanu veres leitava DNA kontsentratsiooni langus 2 tundi (katseseeria A) ja 18 tundi (katseseeria B) pärast sünnitust (Yu jt., 2013).

Vasturääkivaid väiteid on võimalik lugeda *Invernizzi* jt. teadusartiklist (Invernizzi jt., 2002). Nad uurisid 160-ne terve naisterahva veres *SRY* geeni võimalikku detekteeritavust. Kõik uuringus osalejad olid ajavahemikus 1-60 aastat tagasi sünnitanud poisilapse. Tulemustest võib lugeda, et 22 %-l emadest oli võimalik Y-kromosoomil asuva *SRY* geeni verest detekteerida aastakümneid pärast sünnitust. Vaba DNA tsirkuleerimine veres aastaid on vähetõenäoline. Samas on mitmed tööd näidanud loote rakkude pikka eluiga (kuni 27 aastat) ema veres (Bianchi jt., 1996). DNA leidumine veres pikka aega pärast sündi on kooskõlas loote rakkude säilimise uurimisel saadud tulemustega. On võimalik, et loote rakud migreeruvad ema lümfopoeetilistesse organitesse või luuüdisse ning jagunevad seal edasi, vabastades verest detekteeritavat rasedusjärgset loote DNA-d (Bianchi, 1999).

4 MITTEINVASIINE LOOTE DNA SÜNNIEELNE TESTIMINE



Joonis 4. Rakuvaba loote nukleiinhapete (DNA, RNA) avastamine ning kasutusele võtmine sünnieelses testimises (tehtud Bianchi slaidi järgi). Joonisel kasutatud lühendid – cffDNA ehk rakuvaba loote DNA, NGS ehk teise põlvkonna sekveneerimine, SeD ehk sünnieelne diagnostika.

Suurem osa sünnieelsete diagnostika meetoditest vajavad invasiivselt proovide võtmist, mille kõige suuremaks kitsaskohaks on loote ning raseduse tervise ohustamine. Rakuvälise loote DNA avastamine koos tehnoloogia arenguga (Joonis 4) pakub täiesti uusi võimalusi sünnieelses diagnostikas.

4.1 cffDNA eraldamine ning kasutusala

Loote DNA-d leidub ema veres mõnest protsendist 50%-ni (Lo jt., 1998). Rakuvälise DNA eraldamiseks on laialdaselt võimalusi. Protokollis tööpõhimõtte seisneb ema vereplasma (või seerumi) ning rakulise materjali lahutamises tsentrifuugimisel, mille järel plasmast (või seerumist) eraldatakse ning puhastatakse rakuvaba DNA (sisaldab nii ema kui loote geneetilist materjali). Loote DNA olemasolu saadud materjalis võib kontrollida kasutades ema ja loote

DNA-de erinevuseid. Kõige lihtsam meetod on identifitseerida Y-kromosoomile unikaalseid geene (näiteks *SRY*). Selline meetod kitseneb aga ainult meessoost loodetele (Lo jt., 1997).

Teades isa geneetilist tausta on võimalik isa poolt päritud ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP) või punktmutatsioonide abil, mis ema genoomis puuduvad, selekteerida välja loote DNA (Li jt., 2006). Ühealuselisi muutusi on tehniliselt aga keeruline eristada. Peale üksikalleeli muutuse saab loote DNA identifitseerimiseks kasutada mõlemal vanemal esinevaid, kuid erinevate järjestustega, polümorfseid segmente nagu näiteks lühikesed tandemkordused (Liu jt., 2007) või inversioonid/deletsioonid (Page-Christiaens jt., 2006). Standardseid protokolle eelpool mainitud lähenemistele kirjanduses veel ei leidu. Rakuvaba loote DNA erineb ema DNA-st ka epigeneetiliste tunnuste poolest. Kasvaval lootel ning emal on eristatavad metülatsioonimustrid, mida on võimalik rakendada markerina loote DNA eristamiseks (Poon jt., 2002).

Kui eraldatud lootelt pärit geneetilist materjali ei ole analüüsiks piisaval kogusel, on võimalik suurendada loote DNA osahulka. Tänu sellele, et loote DNA on enamasti lühem kui ema ccfDNA fragmendid, tõstetakse uuritavas materjalis loote DNA osahulka lahutades suuremate DNA lõikudest < 300 bp suurused fragmendid. Teiseks võimaluseks on töödelda lahust formaldehüüdiga, mis püsib ema rakkudest DNA eralduse. Selline lähenemine on aga mitmete uurimisrühmade poolt andnud vastakaid ning ebaühtlaseid tulemusi (Benachi jt., 2005).

Loote DNA on verest detekteeritav juba 4. rasedusnädalast (Illanes jt., 2007) ning selle võimalik kasutusampluaa on lai. *SRY* geeni olemasolu määramine meessoost loodete puhul sai juba eelnevalt käsitletud. Lisaks soo määramisele on võimalik rakuvaba loote DNA-d kasutades diagnoosida loote kromosoomhaigusi. Kromosoomspetsiifiliste markerite koguhulga analüüs veres on näidanud täpseid tulemusi aneuploidseuse detekteerimisel. Rakuvaba loote DNA hulka aneuploidse loote korral iseloomustab kontsentratsiooni tõus, kuid tegemist on väikeste kogustega. Tundlikkuse suurendamiseks on võimalik loote DNA-d eelnevalt väljatoodud meetoditega kontsentreerida. Väikese kontsentratsiooni tõusu detekteerimiseks kasutas Lo jt digitaalset PCR-i (Lo jt., 2007). Meetod sarnaneb tavalise PCR-iga, kuid tundlikkuse saavutamiseks lahjendatakse DNA reaktsiooniplaadile nii, et igas reaktsioonis oleks ainult üks huvipakkuv DNA molekul. Antud töös kasutati tehnoloogiat analüüsides 21. kromosoomist eraldatud konkreetse SNP-i kui ka mittepolümorfse piirkonna hulka veres. Meetod vajab suurt cffDNA osahulka algmaterjalis (vähemalt 25 %) ning tulemustes ei ole loote ja ema DNA-sid võimalik eristada. Analüüs digitaalse PCR-iga on aeganõudev ning mahukas protseduur, kuid tänu oma tundlikkusele suutsid Lo jt. määrata 97% loodete ploidsustest (kas euploidne või aneuploidne loode).

cffDNA analüüsimiseks kasutavatest tehnoloogiatest võib veel välja tuua mass spektromeetria, mille tundlikkus ulatub ühe DNA aluse tasandile. Seda on võimalik kasutada näiteks loote-spetsiifiliste alleelide detekteerimiseks (Ding jt., 2004). Laialdaselt pole see meetod veel kasutust leidnud.

Ema veres leiduva loote DNA kontsentratsiooni analüüs võimaldab peale loote genotüübi muutuste jälgida raseduse kulgu ning sellega seotud komplikatsioone, näiteks preeklampsiat (Lo jt., 1999c; Zhong jt., 2001) ja enneaegset sünnitust (Leung jt., 1998). Siiani kõige edukamalt loote DNA-st määratav rasedushaigus on reesuskonflikt. Taanis ja Inglismaal on kliinilises praktikas cffDNA juba laialdast kasutust leidnud RhD veregrupi määramisel (Finning jt., 2004; Scheffer jt., 2011).

Finning jt. uurimustöö seisnes 1997 RhD⁻ raseda verest eraldatud DNA analüüsil PCR-iga määramaks loodete RhD genotüüp. Rohkem kui 99 %-l juhtudest langes genotüüp kokku fenotüübiga (Finning jt., 2008). RhD⁻ rasedate verest loote veregrupi määramine kõikides kliinikumides asendaks ohtlikud invasiivsed meetodid ning tagaks profülaktilise Rh-immunoglobuliinide ravi saamise vaid seda vajavatele patsientidele (Van der Schoot jt., 2006). 2011. aasta andmetel umbes 38-40% RhD⁻ rasedatest läbivad ebavajaliku immunoglobuliinide süstimise (Szczepura jt., 2011).

Loote DNA detekteerimisel ning kasutamisel võivad tekkida mitmesugused komplikatsioonid. Tehniliselt on meetod keeruline, sest emapoolset DNA-d on verest eraldatud materjalis kordades rohkem - cffDNA suhe ema rakuvaba DNA-ga on keskmiselt 1:20 (Nigam jt., 2012). Kogu rakuvaba DNA hulk veres varieerub nii raseduse vältel kui ka indiviidide vahel, mis raskendab optimaalse meetodi väljatöötamist. Samuti võib juhtuda, et kuna loote DNA on suuremal määral pärit platsentast, võib esineda lahknevusi platsenta karüotüübis ning mosaiiksus tõstab valed tulemuste arvu.

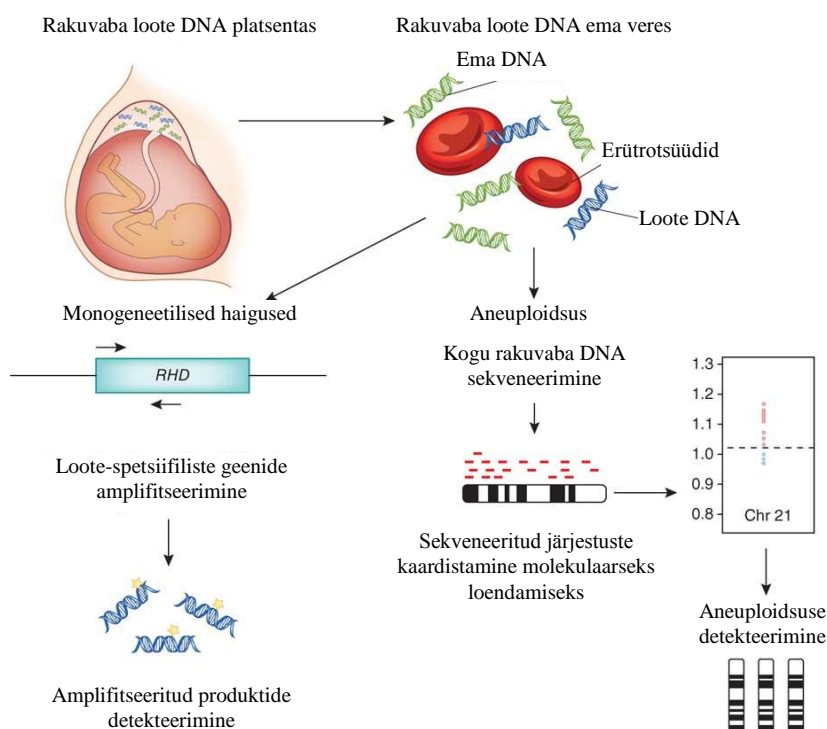
4.2 cffDNA ning teise põlvkonna sekveneerimine

Kõrge läbilaskevõimega sekvenaatori väljatöötamisega pandi alus teise põlvkonna sekveneerimisele. Kokkuvõtlikult toimib meetod lihtsalt - paralleelselt paljundatakse miljonid lühikesed DNA lõigud kolooniateks ning üksteise järel detekteeritakse DNA järjestuses olevad alused. Eelnevalt ei ole uuritava DNA järjestust vaja teada. Saadud fragmendid joondatakse inimgenoomi referentsi abil kokku terveks genoomiks (Shendure ja Ji, 2008).

Raseda veres leiduva rakuvaba loote DNA avastus ning pidevalt areneva teise põlvkonna sekveneerimise (NGS) kombinatsioon on päevakorda toonud potentsiaalselt täiesti uue prenataalse diagnoosimise. Sekveneerimise sobivust sünnieelsesesse diagnostikasse

iseloomustavad meetodi suur läbilaskevõime ning soo ja mutatsiooni neutraalsus. Kui 2010. aastani keskendusid kirjandusest leitavad rakuvaba loote DNA analüüsimise tööd kindla kromosoomi või genoomi piirkonnale, siis *Lo jt.* kirjeldasid esimesena kogu loote genoomi olemasolu ema veres (*Lo jt.*, 2010).

Siiani on kõige enam pööratud tähelepanu sagedaselt esinevate aneuploidsuste detekteerimisele, kuid NGS annab võimaluse analüüsida teisigi genoomi muutuseid (polümorfisme, koopia arvu muutuseid, deletsioone/inversioone, erinevaid mutatsioone jne.). Mitteinvasiivne sünnieelne testimine (NIPT) võib lähitulevikus peale trisoomiate lisada sünnieelsesse diagnoosimisse kogu päritud ning *de novo* mutatsioonide detekteerimise lootel. Rakuvälise DNA sekveneerimiseks on mitu võimalikku lähenemist.



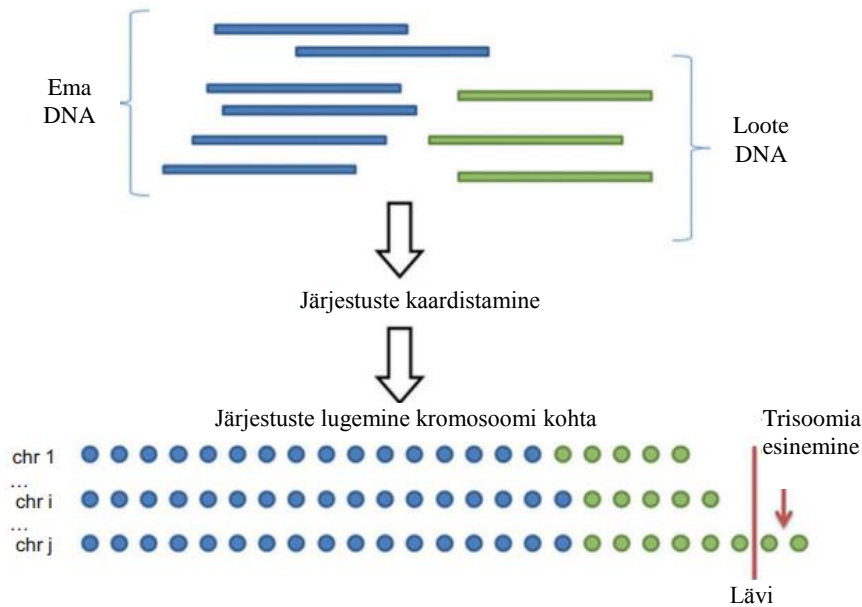
Joonis 5. Ema plasmast saadud rakuvaba DNA on segu loote ning ema DNA-st ja selle kasutusalasid on mitmeid. Konkreetse loote geeni uurimiseks on kõige lihtsam kasutada PCRi meetodit (vasakul). Näiteks on võimalik detekteerida *RHD* geeni olemasolu loote genoomist, kasutades loote DNA spetsiifilisi primereid uuritava geeni amplifitseerimiseks. Aneuploidsuse diagnoosimiseks, näiteks Downi sündroomi korral, kogu rakuvaba DNA sekveneeritakse (paremal). Uuritavate kromosoomide järjestusfragmentide hulgad võrreldakse teiste kromosoomidega, et leida ebanormaalset esinemissagedust. Joonisel näidatud tulemusel on lootel 21. kromosoomi trisoomia, kuna seda on võrreldes teiste kromosoomidega esindatud kordades rohkem (*Diana W. Bianchi*, 2013).

4.2.1 Kogu rakuvälise DNA sekveneerimine

Kogu genoomi sekveneerimise meetod põhineb verest eraldatud rakuvälise DNA sekveneerimisel ning saadud järjestuste molekulaarsel loendamisel (Joonis 6). Rakuvälise DNA fragmentide ühe otsa lühikesed (allpool mainitud töödes 25-36 aluspaari) järjestused sekveneeritakse ning määratakse iga saadud lõigu asukoht genoomis. Uuritavale kromosoomile kaardistatud lõigud loendatakse ning koguarvu võrreldakse euploidsete referentskromosoomide või kõigi sekveneeritud kromosoomidele kaardistatud lõikude hulga. Lõikude üle- või alaesindus viitab aneuploidsusele. Juba 2008. aastal näitasid kaks uurimisrühma, et NGS-i võib edukalt kasutada prenataalses trisoomia detekteerimises.

Fan jt. analüüsisid 18 rasedat, kellel oli 14. rasedusnädal. Valimist üheksa rasedat kandsid 21. kromosoomi, kaks 18. kromosoomi ning üks 13. kromosoomi trisoomiaga loodet. Sekveneeritud fragmentide 25 esimese aluspaari järgi kaardistati saadud lõigud referents inimgenoomile (hg18 – 2006. aasta märtsis avaldatud inimese referents genoom, *NCBI Build 36.1*). Iga uuritava raseda verest saadi umbes 5 millionit järjestust, mis kattis keskmiselt 4 % kogu inimgenoomist. Õigesti määrati kõikide loodete aneuploidsus, karüotüüpide kinnitamiseks viidi rasedatel läbi loote kromosoomanalüüs (*Fan jt., 2008*).

Chiu jt. analüüsisid samuti NGS-i võimet detekteerida ema verest loote aneuploidsust. Nende valim koosnes 28-st rasedast, kellest pooled kandsid 21. kromosoomi trisoomiaga last. Verest eraldatud DNA fragmentide 36 esimest aluspaari sekveneeriti ning saadud järjestused kaardistati referentsgenoomile. Aneuploidsus määrati molekulaarsel loendamisel. Kõigi 28 loote karüotüüp määrati õigesti (*Chiu jt., 2008*). Mõlemas eelmainitud töödes valepositiivseid tulemusi ei saadud.



Joonis 6. Molekulaarse loendamise põhimõte. Verest saadud rakuvaba DNA sekveneeritud lõigud kaardistatakse vastavatele genoomi piirkondadele ning iga kromosoomi kohta saadud *readid* loetakse kokku (Nepomnyashchaya jt., 2013).

4.2.2 Suunatud rakuvälise DNA sekveneerimine

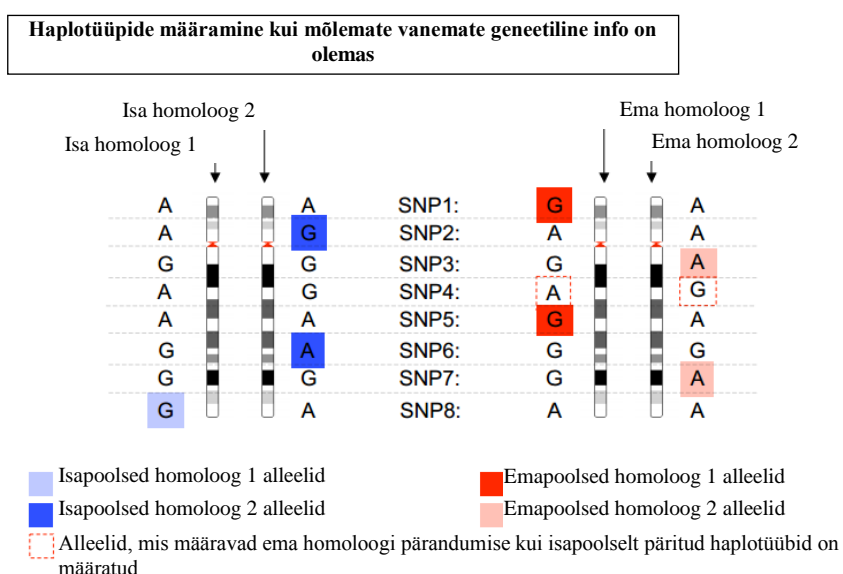
Kui limiteerida sekveneerimine ning analüüs ainult huvipakkuvatele genoomi piirkondadele või markeritele, vähendab see protseduuri keerukust, aega ning kallidust. *Liao* jt. demonstreerisid, et lisades DNA töötlemisele rikastusetapi, tõuseb huvipakkuva (*Liao* jt. töös X kromosoom) rakuvaba DNA regiooni esindatus rohkem kui 200 korda, mis tõstab sekveneerimise tulemuste täpsust ja tundlikkust (*Liao* jt., 2011). Suunatud analüüsiks saab amplifitseerida konkreetseid regioone (21. kromosoom) või markereid (SNP) genoomis.

Sparks jt. uurimistöös eraldati 298 raseda DNA plasma proovist. Rakuvaba DNA rikastuseks komplekteerisid nad eraldi 18. ning 21. kromosoomil asuvate lookustele spetsiifilisi sadu lühikesi oligonukleotiide. Uuritavad kromosoomid amplifitseeriti ning seejärel sekveneeriti (selekteeritud regioonide digitaalsel analüüsil ehk DANSR meetodil). Kõik 39 Downi ning seitse Edwardsi sündroomiga loote aneuploidsus määrati 100 %-lise täpsusega (*Sparks* jt., 2012b).

Oma uurimustöös kasutasid *Liao* jt. loote aneuploidsuse määramiseks rikastatud ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP-ide) suunatud sekveneerimist (*Liao* jt., 2012). Uurimistöös rikastati ema verest saadud DNA kromosoomidel 7, 18 ja 21 asuvate 2906 SNP-i suhtes. Nad kasutasid amplifitseerimiseks SNP-e, mis oleksid ema genoomis homosügootsed ning loote genoomis heterosügootsed. Kuna antud uurimistöö oli meetodi tööpõhimõtte

tõestamine, siis kasutasid nad sobivate SNP-ide leidmiseks invasiivselt saadud loote DNA mikrokiibil genotüpiseerimise tulemusi. Eelnevalt loote genoomi mitte teades on võimalik informatiivsed SNP-id valida näiteks vanemate genotüüpides leiduvate homosügootsete, kuid erinevate alleelide suhtes, kõikide SNP-ide seast.

Kasutades SNP-e on võimalik ema verest eraldatud rakuvälisest DNA-st identifitseerida vanematelt päritud haplotüübid. Haplotüüp on mitme lookuse alleelide kogum, mis pärandub ühe üksusena. Loote genoom on vanemate nelja haplotüübi põhjal saadud kombinatsioon, millest kolm leidub raseda veres – ema haplotüübid (päritav ning mittepäritav) ja isa poolt päritud haplotüüp. Isa poolt mittepäritud haplotüüpe on võimalik ennustada või leida isa genoomi analüüsides. *Fan jt* tõestasid, et vanema haplotüübile spetsiifiliste markerite kokkulugemisel on võimalik ennustada haplotüüpide päritavus ning läbi selle ka loote genoom. Markeritena kasutasid nad allelele, mis on esindatud ainult ühes neljast haplotüübist (Joonis 7). Autosomaalsed kromosoomid jaotati 2,5-3,5 Mb suurusteks lõikudeks (liikumisaknaks 100 kb) ning X-kromosoom 5-7,5 Mb suurusteks lõikudeks. Igal lõigul asuvad markerid loeti üle ning vastavalt jagati haplotüüpide pärinemine (*Fan jt.*, 2012).



Joonis 7. Mõtlemata vanema haplotüüpidele omaste SNP-ide määramine (*Fan jt.*, 2012).

Tingituna erinevatest teguritest võib mitmetel juhtudel puududa isa geneetiline info. Isalt päritud haplotüüpe on võimalik määrata ema veres esinevate loote alleelide põhjal, mis on puudu ema genoomis (*Fan jt.*, 2012).

Tänašeks päevaks on tehtud hulgaliselt suuremahulisi uuringuid valideerimaks teise põlvkonna sekveneerimise meetodi täpsust loodete trisoomiate detekteerimisel (Ehrich jt., 2011; Chiu jt., 2011; Palomaki jt., 2011; Bianchi jt., 2012; Palomaki jt., 2012).

4.3 Kommertsiaalsed prenataalsed testid

Viimasel paaril aastal on rakuvaba loote DNA analüüs sekveneerimise meetodil olnud mitmete suuremahuliste teadustööde põhiidee. Paralleelselt meetodite väljatöötamisega on alates 2011. aastast turule tulnud mitmeid mitteinvasiivseid sünnieelseid teste (NIPT) (Tabel 4). Kõik hetkeseisuga saadaval olevad testid määravad sagedasemalt esinevate autosomaalsete kromosoomide arvu kordsust (21., 18., ja 13. kromosoom) ning mõne testi puhul on võimalik teada saada ka loote sugu ja X-kromosoomi arvu muutused. Kõige esimesena tuli turule *MaterniT21 PLUS* test (Sequenom, Inc). Lisaks on saadaval *Harmony* (Ariosa Diagnostics, Inc), *verifi* (Verinata Health, Inc) ja *Panorama* (Natera, Inc) testid. Kõik eelpool mainitud NIPT testid on väljatöötatud Ameerika Ühendriikides. *PrenaTest* (Lifecodexx AG) on esimene Euroopa ning *NIFTY* (BGI Health) ja *BambniTest* (Berry Genomics Co., Ltd) Hiina turul leitavad testid. *Harmony* ning *Panorama* teste on võimalik Eestis tellida.

Tabel 4. Hetkel turul olevate prenataalsete testide võrdlus.

	MaterniT21 PLUS	verifi	Harmony	Panorama	NIFTY	PrenaTest	BambniTest
Platvorm	NGS (kogu genoom)	NGS (kogu genoom)	Suunatud NGS	SNP-baasil	NGS (kogu genoom)	NGS (kogu genoom)	NGS (kogu genoom)
Kromosoomidel uuritavad haigused	Kromosoomide 13, 18, 21 trisoomia; sugukromosoomide aneuploidus	Kromosoomide 13, 18, 21 trisoomia; X kromosoomi aneuploidus; loote sugu	Kromosoomide 13, 18, 21 trisoomia; X kromosoomi aneuploidus	Kromosoomide 13, 18, 21 trisoomia; sugukromosoomide aneuploidus; triploidus; mikrole-tsioonid	Kromosoomide 13, 18 ja 21 trisoomiad	Kromosoomide 13, 18 ja 21 trisoomiad	Kromosoomide 9, 13, 18 ja 21 trisoomiad
Tulemuste saamine	8-10 päeva	8-10 päeva	8-10 päeva	15 päeva	10 päeva	6-7 päeva	10 päeva
Teenuse maksumus (€)	2000*	1148*	465*	2000*	611*	825*	365*
Turul alates	Oktoober 2011	Märts 2012	Mai 2012	Detsember 2012	Oktoober 2013	Oktoober 2013	N/A
Turg	USA	USA	USA	USA	Hiina	Euroopa	Hiina

*hinnad võivad varieeruda

5 ARUTELU

Traditsiooniline sünnieelne diagnostika on viimaste aastateni olnud ainuke pakutav lahendus prenataalseteks uuringuteks, kuid alates 2011. aastast on seniste meetodite kõrvale kerkinud alternatiivsed lahendused. Uuemate meetodite vajadus on kerkinud esile sünnieelse diagnoosimise tundlikkuse tõstmiseks. Ultraheliuuring on üks vanemaid meetodeid, mis on küll ohutu, aga loote haiguste määramisel ebatäpne (Efrat jt., 2006). Hormoonidel põhinevad testid on madala usaldusväärsusega – väikese riskiga rasedatel esineb vale-positiivseid tulemusi umbes 5 %-il, mis viivad lapseootel naised ilmaaegu stressisituatsiooni ning ebavajalike invasiivsete protseduuride teostamiseni (Proffitt, 2012). AC ja CVS on kaks kõige laialdasemalt kasutusel olevat invasiivset protseduuri, mille abil on võimalik loote kromosoomihaiguseid diagnoosida. Mõlemad meetod on küll 99% täpsed, kuid ühel kuni kahel naisel 100-st võib esineda protseduuri järgselt raseduse katkemine (Alfirevic jt., 2003).

Invasiivsed protseduurid omavad otsest riski loote ja ema tervisele ning võivad olla rasedale valulikud ning stressirohked. Eestis läbi 2013. aastal invasiivse protseduuri 879 rasedat (allikaks: M.Sitska ettekanne „Pärilike haiguste sünnieelne diagnoosimine Eestis 2013 aastal“). Neist ainult 63 avastati loote kromosoomanomaalia. Rohkem kui 92% rasedatest läbisid ebavajaliku invasiivse protseduuri. Antud näide illustreerib täpsemate esmaste sünnieelsete testide vajadust. Rakuvaba loote geneetilise materjali leidumise avastus koos tehnoloogia arenguga andis võimaluse täiesti uudsete sünnieelsete diagnostika meetodite arendusele. Kõige suurima potentsiaaliga täiendamaks siiani kasutusel olevaid sünnieelse diagnostika meetodeid on rakuvälise loote DNA analüüsimine teise põlvkonna sekveneerimisega. Meetod ei vaja loote ja ema DNA eelnevat eristamist, on suure läbilaskvusega, tundlik ning võimaldab potentsiaalselt vaadelda nii kromosoomi arvu muutuseid kui ka monogeenseid haiguseid ühe analüüsiga.

Käesoleva töö mitteinvasiivsete DNA testide tutvustuses välja toodud sekveneerimisvõimalustel on tehniliselt mitmeid puuduseid. Molekulaarsel loendamisel on oluline, et huvipakkuvate kromosoomide lõikude arv oleks euploidse loote korral võimalikult sarnane. Kromosoomide erinev suurus ning amplifikatsiooni edukust mõjutav guaniini-tsütoosiini (GC) sisaldus võivad mõjutada sekveneerimisel saadud lõikude arvu. On näidatud, et nii 18. kui ka 13. kromosoomi trisoomia määramise tundlikust tõstab GC sisalduse korrigeerimine (Chen jt., 2011). Täpsuse ning tundlikkuse saavutamiseks on oluline sekveneeritud fragmentide ehk *read*-ide hulk. Kogu genoomi sekveneerimise mitteinvasiivsed trisoomia diagnoosimised kasutavad umbes 0,2 kordset kattuvust. Selle aastanumbris ilmunud Chandrananda jt artikkel näitab Downi sündroomi määramise 100 %-list täpsust kasutades

kõigest 0,03 kordset kattuvust (umbes kaks miljonit *read*-i). Kuluefektiivseks tegi analüüsi ka mitme raseda proovide koossekveneerimine ühel sekveneerimisrajal. (Chandrananda jt., 2014). Sügavam sekveneerimine tõstab koheaselt meetodi kallidust. SNP-ide analüüsimeetod vajab referentsi genoomi ega oma probleemset amplifikatsioonitasemete erinevust, kuid meetod vajab kõrgemat kattuvust väiksemate genoomi muutuste detekteerimiseks. SNP-ide analüüsimismeetod võimaldab sarnast tulemust üle kõigi huvipakkuvate kromosoomide, nt. Zimmermann jt. näitasid oma tulemustes >99 %-list täpsust 13., 18., 21., X ja Y kromosoomide arvu kordsuse määramisel. SNP-ide analüüs võimaldab potentsiaalselt identifitseerida veel lisaks loote genoomi triploidsust ja uniparentaalset disoomiat (Zimmermann jt., 2012).

Kommertsiaalsete rakuvaba loote DNA testide hinnad on igapäevases kliinilises praktikas kasutamiseks veel liiga kõrged. Võrdluseks toon Eestis pakutava Harmony testi hinna Ida-Tallina Keskhaigla Naistekliiniku kodulehe andmetel, ning Haigekassa ja TÜ Naistekliinikumi kodulehe andmetel saadud loote ultraheliuuringu ning vereanalüüsi kombineeritud testi OSCAR-i, invasiivse amniotsenteesi ning FISH analüüsi hinnad. Mitteinvasiivne Harmony test maksab ravikindlustajale kõrge kromosoomhaiguse riskiga raseda korral 465 eurot ning antud analüüsiga on võimalik määrata Downi, Edwardsi ning Patau sündroomid koos sugukromosoomide analüüsiga. Mitteinvasiivsel meetodil saadud anomaaliade valideerimiseks tuleb juurde arvestada kromosoomanalüüsi hind (2013. aasta andmetel leiti kromosoomanomaalia 6,2 %-l invasiivset protseduuri läbinud rasedatel). Kui arvutada traditsioonilise sünnieelse diagnostika kulud kokku, siis läbides OSCAR-i testi, invasiivse amniotsenteesi ning kromosoomanalüüsi FISH meetodil, läheb see ravikindlustajale maksma ~412 eurot. Mitteinvasiivse testi kasutamine oleks antud olukorras kallim. Invasiivse protseduuriga kaasneb aga risk raseduse katkemisele, loote tervisele ja ka emotsionaalne stress, mida ei saa rahast vähem tähtsaks pidada.

Haiguste diagnoosimisel on oluline ka meetodi kiirus. Mitteinvasiivsete testide korral kulub vere andmisest tulemuste saamiseni kirjanduse andmetel maksimaalselt 10 päeva. Invasiivsete loote kromosoomanalüüsi vastuse saamiseni võib kuluda 2-3 nädalat. Pikem periood on tingitud invasiivselt saadud rakkude kultiveerimisetapi vajalikkusest. Invasiivseid protseduure on võimalik läbi viia alates 11. nädalast (CVS), samas loote DNA on osadel rasedatel detekteeritav juba 4. rasedusnädalast. Siiski ei ole kirjanduses leitavad meetodid võimalised raseduse algusele omast loote DNA osahulka (<4 %) analüüsis kasutama, kõige varasemalt on võimalik prenataalset testi läbi viia 9. rasedusnädalal (tabel 5). Rakuvaba loote DNA annab võimaluse alustada sünnieelse testimisega varem, mis on tuleviku meditsiini ravivõimalustele mõeldes väga oluline. Bianchi jpt. rõhutavad alles areneva organismi arengu

mõjutamise võimalustele (nt. Loote neurogeneesi etapis Downi sündroomi ravi), kuid ilma täpse diagnoostika ei ole ravivõimaluste olemasolust mingit kasu (Bianchi, 2012).

Mitteinvasiivse DNA testimine annab sekveneerimise edusammudega koos võimaluse peale trisoomiate diagnoosida rakuvabast DNA-st alternatiivseid loote genoomi subkromosomaalseid muudatusi nagu koopia-arvu variatsioonid või ühenukleotiidsed muutused. Samuti on *Kitzman* jt. ning *Fan* jt. oma uurimistöodes näidanud verest eraldatud DNA põhjal loote kogu genoomi konstrueerimise võimalikkuse (*Kitzman* jt., 2012; *Fan* jt., 2012). Kogu genoomi andmeid on keerulisem interpreteerida, kuid kliinilises praktikas kasutusele võetud genoomi kodeeriva ala ehk eksoomi sekveneerimine annaks võimaluse loote haiguste diagnoosimisele.

Kliiniliselt olulised parameetrid usaldusväärseks skriinimiseks on prenataalse testi tundlikkus ning täpsus. Siiani kasutusel olevate traditsiooniliste mitteinvasiivsete meetodite tundlikkus jääb vahemikku 85-90% ning vale-positiivsete tulemuste arv 3-5% vahele (*Alfirevic* jt., 2003).

Tabelis 5 väljatoodud NGS uuringutes ning kirjanduses leitatavates artiklites varieerub meetodide tundlikkus. Keskmiselt on näidatud Downi sündroomi puhul aneploidsuse diagnoosimise täpsuseks >99 %, Edwardsi sündroomi korral >97 % ning Patau sündroomi määramisel 78,9 %. Kromosoomide 18 ja 13 madalamat tundlikkust on võimalik seletada madala GC nukleotiidide sisaldusega antud kromosoomides, mis vähendab kvaliteetseid sekveneerimisandmeid NGS meetodil. SNP meetodit kasutades on *Palomaki* jt. näidanud samaväärseid (>90 %) trisoomia detekteerimise tulemusi kõikides kromosoomides (*Palomaki* jt., 2012).

NGS uuringute tagasilöökideks on enamasti proovi kõlbmatus madala loote DNA osahulga tõttu (< 4%) ning tehnilised vead. Vale-negatiivsed tulemused on enamasti tingitud eelpool mainitud tehnilistest probleemidest. Vale-positiivsed tulemused on sõltuvuses nii tehnilisest vigadest kui ka bioloogilisest nähtustest nagu „kaduv kaksik“ ja platsenta mosaiiksus. Rakuvaba loote DNA pärineb platsenta apoptootilistest rakkudest, mis võivad olla mosaiiksed. See fenomen on tingitud ebakorrapärase mitootiliste ning meiootiliste rakkude jagunemisest. *Grati* jt. artiklis on tungivalt soovitatud muuta cffDNA testimine cfpDNA ehk rakuvaba platsenta DNA testimiseks, võttes arvesse veres ringleva loote DNA tegelikku päritolu. Tehnoloogia areng võib loote DNA testimise efektiivsust küll tõsta, kuid 100 %-list tundlikkust ei saavutata ilmselt kunagi (*Grati* jt., 2014).

Tabel 5. Suuremahuliste NGS-iga loote DNA uuringute analüüside tulemused.

Uuring	Downi sündroom		Edwardsi sündroom		Patau sündroom	
	Tundlikkus (%)	Vale-positiivsed tulemused(%)	Tundlikkus (%)	Vale-positiivsed tulemused(%)	Tundlikkus (%)	Vale-positiivsed tulemused(%)
(Ehrich jt., 2011)	100	0,24	-	-	-	-
(Chiu jt., 2011)	100	2,10	-	-	-	-
(Palomaki jt., 2012)	98,60	0,20	100,00	0,30	91,70	0,97
(Bianchi jt., 2012)	98,90	0,00	92,10	0,00	78,6,0	0,00
(Sparks jt., 2012a)	100,00	0,81	100,00	0,81	-	-
(Ashoor jt., 2012)	100,00	0,00	98,00	0,30	-	-
(Norton jt., 2012)	100,00	0,03	97,40	0,06	-	-
(Dan jt., 2012)	100,00	0,03	100,00	0,03	-	-
(Nicolaides jt., 2012)	99,00	0,10	99,00	0,10	-	-
(Song jt., 2013)	100,00	0,00	100	0,06	100,00	0,00
(Gil jt., 2013)	>99,00	0,00	>99,00	0,10	34,00	0,00

Kui jätta kõrvale tehnilised ja materjaalsed aspektid, siis NGS-i kasutmine kliinilises praktikas on tõstatanud mitmeid eetilisi küsimusi. Loote genoomi sekveneerimine võib tuua endaga kaasa raseduse tahtliku katkestamise suurenemise. Mitmetes kultuurides on probleemid ühe soo eelistamine teisele. Eetilistes küsimustes kaasaráakijad rõhuvad loote võimetusele enda eest otsustada. Kogu loote genoomi järjestuse olemasolu ning võimalike haigusseoseliste geenide leidmine tekitab suures matus geneetilist infot, mida oleks võimalik rasedale teavitada. *Kitzman* jt. detekteerisid loote genoomi sekveneerimisel 44 spontaanset punktmutatsiooni, millest üks oli tugevalt seotud Parkinsoni tõvega. Kas antud informatsiooni edastamine tulevasele emale on vajalik? *Dennis Lo*, mitmete eelpool viidatud artiklite autor ning rakuvaba loote DNA leidumise avastaja, usub et prenataalse sekveneerimise test peaks raporteerima umbes 20 kõige sagedasema haigusega seotud tulemust. „Me ei tea, kuhu on

meditsiin jõudnud paarikümne aasta pärast, seega tuleks sekveneeritud andmed talletada“ on tema arvamus.

Olles välja toonud mitmeid NIPT meetodi positiivseid ja negatiivseid külgi üksikraseduste näidetel, arutlen meetodi efektiivsuse üle mitmikraseduste korral. Struktuursed ebanormaalsused ning Downi sündroomi juhtumid on mitmikraseduse puhul sagedasemad. Olulist rolli mängib seal meditsiini areng ning abistava reproduktiiv-tehnoloogia kättesaadavus, tänu millele on mitmikute saamine viimase paari aastakümnega kasvanud, eriti kõrgemas eas naiste puhul (Odibo jt., 2003; Hansen jt., 2013).

Siiani kasutusel olnud markerite skriinimine ning ultraheliuuringud ei anna mitmikraseduse puhul üksikrasedusega võrreldavaid tulemusi (Spencer, 2000; Cleary-Goldman ja Berkowitz, 2005). Biomarkerite analüüs on mitmikraseduse korral ebatäpne ning näiteks Downi sündroomi riski arvutamine toimib kaksikute puhul edukamalt kombineerides NT mõõtmise tulemused ema vanusega. (Bush ja Malone, 2005). Kuid ka sellise kombineeritud meetodi avastusprotsent on kõigest 75-85 % ning vale-positiivseid tulemusi pea 5 %-il juhtudest. Seega oleks vaja meetodit, millega saaks hinnata võimalikult täpselt mitmikrasedusel loodete geneetilisi ebakorrapärasusi ning struktuurseid anomaaliaid. Selle tühja koha võiks täita sekveneerimisel põhinev lähenemine.

Kaksikute võivad olla kas monosügootsed, kui nad on geneetiliselt identsed ning sellisel juhul võib analüüsi vaadelda kui „üksikrasedust“. Kui kaksikud on disügootsed ehk esineb geneetiline varieeruvus, siis võib ka ainult ühel lootel esineda aneuploidusust. Loodete sügootsus on mitmikraseduste puhul edasiste analüüside määramiseks kliiniliselt tähtis. Qu jt. on lähenenud probleemile veres leiduva loote DNA kaudu. Nende töö on esimene, mis määrab kaksikute sügootsust kasutades teise põlvkonna sekveneerimist. Sekveneeritud ema ja loodete järjestusi võrreldi omavahel ning otsiti SNP lookuseid, kus ema oleks homosügoot ning vähemalt üks loodetest heterosügoot. Seejärel arvutati iga informatiivse SNP-i kohta loote DNA kontsentratsioon ning edasi hinnati samade SNP-ide kontsentratsioonide kõikumisi uuritavates lookustes. Ühemunakaksikute puhul oodati samasugust loote DNA kontsentratsioonide kõikumist, disügootsete loodete puhul oodati suuremat varieeruvust (mõnes lookuses mõlemad looted homosügootid, mõnes üks loode heterosügoot). Saadud tulemused olid täpsemad kui ultraheliuuring ning meetod ohutum kui invasiivsed protseduurid. Samuti võimaldab selline lähenemine määrata erimunakaksikute korral mõlema loote DNA hulk veres (Qu jt., 2013).

Mitmikraseduste diagnostikas on veel arenguruumi. Kõigis siiani tehtud uuringutes osalenud rasedad on enamik hilises raseduse staadiumis. Samuti tuleb arvestada sellega, et geneetilise materjali hulk veres erinevate loodete puhul võib varieeruda (Leung jt., 2013; Qu

jt., 2013). Selleks, et kaksikute puhul saaks sekveneerimist kliinilises praktikas edukalt kasutada, tuleks viia läbi suuremahulisi uuringuid varases rasedusstaadiumis ning analüüsida saadud tulemuste täpsust. Puuduvad veel ka suuremad uuringud ning andmed 18. ning 13. kromosoomide trisoomiate määramise kohta mitmikraseduste korral.

Antud töös on väljatoodud loote RNA leidumine ema veres ning selle potsentsiaalne kasulikkus sünnieelses raseduse jälgimises. RNA detekteerimise võimalikkust on raporteerinud mitmed teadusartiklid, kuid selle edukus varieerub töödes ning suure läsilaskvusega meetodid RNA analüüsiks veel keerulised. *Tsui* jt. värskest ilmunud artikkel tõestab loote RNA sekveneerimise potsentsiaali rakendamaks meetodit sünnieelses testimises (*Tsui* jt., 2014), kuid selle keerukuse ja mitmete arendamist vajavate probleemide pärast ei käsitletud antud teemat lähemalt.

Sünnieelse diagnostika suund on pööratud I trimestri diagnoosimise ning invasiivsete protseduuride vähendamisele. Mitteinvasiivne prenataalne testimine täidab mõlemad püstitatud eesmärgid. Rakuvaba loote DNA analüüs võimaldab jälgida nii raseduse kulgu kui ka loote kromosoomhaiguseid. Mitteinvasiivne DNA testimine võiks olla sünnieelses diagnostikas primaarne test, mis vähendaks ~90 % invasiivsetest protseduuridest. Tehnoloogia ning teadmiste edasiarenemisel näen DNA analüüsimisel suurt potsentsiaali asendada tulevikus mitmeid seniseid sünnieelse diagnostika meetodid.

KOKKUVÕTE

Käesolevas referatiivses bakalaureusetöös antakse ülevaade kliinilises praktikas kasutusel olevast sünnieelsest diagnostikast ning selle meetoditest. Põhjalikumalt on käsitletud uuemate mitteinvasiivsete DNA testide võimalusi ning eeliseid ja puuduseid arutelu osas.

Loote aneuploidsus esineb vähemalt 5 %-l kliiniliselt jälgitud rasedustest. Kasutusel olevad sünnieelse diagnostika mitteinvasiivsed meetodid ei ole võimelised diagnoosima loote genoomimuutuseid täpselt. Invasiivsed meetodid tagavad küll 99 %-lise tõenäosusega õige diagnoosi, kuid protseduur ise ohustab loote ja ema tervist kuni raseduse katkemiseni 1 naisel 100-st.

Mitteinvasiivne loote DNA testimine on eelkõige täiesti ohutu, kuid viimaste aastate suurearvulised uuringud on näidanud ka kõrgeid tulemusi meetodid täpsuses ja tundlikkuses, määrates sageli esinevaid autosomaalseid trisoomiad. Testiga kaasneb 3-5 korda vähem valepositiivseid tulemusi, mis on väga oluline rasedale otsuste langetamisel sesoses lootega. Mitteinvasiivne DNA testimine omab mitmeid puuduseid ning seega ei saa seda liigitada diagnostiliseks meetodiks, kuid testimise eelised viitavad potsentsiaalile tulevikus areneda diagnostiliseks protseduuriks. Selleks oleks vaja edasisi kliinilisi uuringuid madala riskiga ning mitmikuid kandvate rasedate seas.

Mitteinvasiivse loote DNA testimine on käesolevas kliinilises praktikas suunatud eelkõige kõrge riskiga rasedate skriinimismetodiks. Meetodi täpsus ning varajane läbiviimise aeg (juba 9. rasedusnädal) võimaldaks antud testil olla esmane sünnieelne analüüsimeetod.

Fetal DNA sequencing – new era in prenatal diagnostics

Kelli Grand

SUMMARY

It has been less than 20 years since circulating cell-free fetal DNA (cffDNA) was shown to be detectable in mother's plasma. At that time it was PCR and amplification of male fetus' gene *SRY* that proved the usefulness of cffDNA (Lo jt., 1997). That demonstration was the beginning of the breaking point in the prenatal diagnosis we had been using so far.

Fraction of fetal DNA (ffDNA) in mother's circulatory system starts from few procent in early gestational age and increases up to 12 times with the course of pregnancy (Wang jt., 2013). It mostly originates from apoptotic placenta cells (Bianchi, 2004) and the fragments are no more than 300 bp long (Chan jt., 2004). Different studies have reported various methods using cffDNA in prenatal testing but it was not until next generation sequencing (NGS) became available that it was understood how much potential non-invasive DNA testing (NIDT) has in.

There are two major approaches to NIDT – whole genome sequencing and targeted sequencing. First one uses the cell-free DNA fragments (which is a combination of mother's and fetus' DNA) from mother's plasma and first 25-36 bp of all the fragments are sequenced. Sequenced reads are mapped against reference genome. For analysis, all the mapped reads are counted and any over- or underrepresentation of reads in the interested area (e.g. 21. chromosome associated with Down syndrome) refers to aneuploidy. Targeted sequencing differs in selecting the interested regions of genome for amplification and sequencing only those.

Prenatal testing using cffDNA has presented high levels of sensitivity (>99% in the case of 21. chromosomal trisomy) and low levels of false positive values (< 1%) in many works (Bianchi jt., 2012). It is also fully safe compared to invasive prenatal diagnostic methods (1 out of 100 women miscarriage) (Tabor jt., 2009). NIPT has its setbacks due to technical and biological issues e.g. too low ffDNA, mosaicism in placenta, difficulties with multiple pregnancies etc. Despite the newness of the method, the first commercial NIPT came to market in 2011.

NIPT methods are still in the progress but as the technology and knowledge emerges NIPT has the ability to replace prenatal diagnostic methods used to date.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat Lili Milanit, kes mind alati hea nõu ja jõuga abistab. Väga-väga suure tänuavalduse tahan teha oma armsale emale kogu selle mõõtmatu toetuse ja kannatlikkuse eest! Tänan ka kõiki häid sõpru ja töökaaslaseid abivalmiduse ja heade sõnade eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alfirevic, Z., Sundberg, K., Brigham, S. 2003, "Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis", *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. (3), no. 3, pp. CD003252.
- Allen, E.G., Freeman, S.B., Druschel, C., Hobbs, C.A., O'Leary, L.A., Romitti, P.A., Royle, M.H., Torfs, C.P., Sherman, S.L. 2009, "Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects", *Human genetics*, vol. 125, no. 1, pp. 41-52.
- Anker, P., Stroun, M. 1997, "Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by frog auricles", *Arch. Sci. Genève*, no. 30, pp. 263-278.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L.C., Rezende, J.C., Nicolaides, K.H. 2013, "Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics", *Ultrasound in obstetrics, gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 41, no. 1, pp. 26-32.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., Nicolaides, K.H. 2012, "Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 206, no. 4, pp. 322.e1-322.e5.
- Benachi, A., Yamgnane, A., Olivi, M., Dumez, Y., Gautier, E., Costa, J.M. 2005, "Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum", *Clinical chemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 242-244.
- Bianchi, D.W. 1999, "Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis", *British journal of haematology*, vol. 105, no. 3, pp. 574-583.
- Bianchi, D.W. 2004, "Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review", *Placenta*, vol. 25 Suppl A, pp. S93-S101.
- Bianchi, D.W. 2012, "From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges", *Nature medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1041-1051.
- Bianchi, D.W., Platt, L.D., Goldberg, J.D., Abuhamad, A.Z., Sehntert, A.J., Rava, R.P., MatErnal BLoOd IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group 2012, "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing", *Obstetrics and gynecology*, vol. 119, no. 5, pp. 890-901.
- Bianchi, D.W., Zickwolf, G.K., Weil, G.J., Sylvester, S., DeMaria, M.A. 1996, "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 2, pp. 705-708.
- Boada, R., Janusz, J., Hutaff-Lee, C., Tartaglia, N. 2009, "The cognitive phenotype in Klinefelter syndrome: a review of the literature including genetic and hormonal factors", *Developmental disabilities research reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 284-294.
- Bondy, C.A., Turner Syndrome Study Group 2007, "Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 92, no. 1, pp. 10-25.
- Botezatu, I., Serdyuk, O., Potapova, G., Shelepov, V., Alechina, R., Molyaka, Y., Ananov, V., Bazin, I., Garin, A., Narimanov, M., Knysh, V., Melkonyan, H., Umansky, S., Lichtenstein, A. 2000, "Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism", *Clinical chemistry*, vol. 46, no. 8 Pt 1, pp. 1078-1084.
- Buiting, K. 2010, "Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome", *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, vol. 154C, no. 3, pp. 365-376.

- Bush, M.C., Malone, F.D. 2005, "Down syndrome screening in twins", *Clinics in perinatology*, vol. 32, no. 2, pp. 373-86, vi.
- Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W., Lo, Y.M. 2004, "Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma", *Clinical chemistry*, vol. 50, no. 1, pp. 88-92.
- Chandrananda, D., Thorne, N.P., Ganesamoorthy, D., Bruno, D.L., Benjamini, Y., Speed, T.P., Slater, H.R., Bahlo, M. 2014, "Investigating and correcting plasma DNA sequencing coverage bias to enhance aneuploidy discovery", *PloS one*, vol. 9, no. 1, pp. e86993.
- Chen, E.Z., Chiu, R.W., Sun, H., Akolekar, R., Chan, K.C., Leung, T.Y., Jiang, P., Zheng, Y.W., Lun, F.M., Chan, L.Y., Jin, Y., Go, A.T., Lau, E.T., To, W.W., Leung, W.C., Tang, R.Y., Au-Yeung, S.K., Lam, H., Kung, Y.Y., Zhang, X., van Vugt, J.M., Minekawa, R., Tang, M.H., Wang, J., Oudejans, C.B., Lau, T.K., Nicolaides, K.H., Lo, Y.M. 2011, "Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing", *PloS one*, vol. 6, no. 7, pp. e21791.
- Chen, X., Bonnefoi, H., Diebold-Berger, S., Lyautey, J., Lederrey, C., Faltin-Traub, E., Stroun, M., Anker, P. 1999, "Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 5, no. 9, pp. 2297-2303.
- Chen, X.Q., Bonnefoi, H., Pelte, M.F., Lyautey, J., Lederrey, C., Movarekhi, S., Schaeffer, P., Mulcahy, H.E., Meyer, P., Stroun, M., Anker, P. 2000, "Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 6, no. 10, pp. 3823-3826.
- Chiu, R.W., Akolekar, R., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Sun, H., Chan, K.C., Lun, F.M., Go, A.T., Lau, E.T., To, W.W., Leung, W.C., Tang, R.Y., Au-Yeung, S.K., Lam, H., Kung, Y.Y., Zhang, X., van Vugt, J.M., Minekawa, R., Tang, M.H., Wang, J., Oudejans, C.B., Lau, T.K., Nicolaides, K.H., Lo, Y.M. 2011, "Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 342, pp. c7401.
- Chiu, R.W., Chan, K.C., Gao, Y., Lau, V.Y., Zheng, W., Leung, T.Y., Foo, C.H., Xie, B., Tsui, N.B., Lun, F.M., Zee, B.C., Lau, T.K., Cantor, C.R., Lo, Y.M. 2008, "Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 51, pp. 20458-20463.
- Cleary-Goldman, J., Berkowitz, R.L. 2005, "First trimester screening for Down syndrome in multiple pregnancy", *Seminars in perinatology*, vol. 29, no. 6, pp. 395-400.
- Dan, S., Wang, W., Ren, J., Li, Y., Hu, H., Xu, Z., Lau, T.K., Xie, J., Zhao, W., Huang, H., Xie, J., Sun, L., Zhang, X., Wang, W., Liao, S., Qiang, R., Cao, J., Zhang, Q., Zhou, Y., Zhu, H., Zhong, M., Guo, Y., Lin, L., Gao, Z., Yao, H., Zhang, H., Zhao, L., Jiang, F., Chen, F., Jiang, H., Li, S., Li, Y., Wang, J., Wang, J., Duan, T., Su, Y., Zhang, X. 2012, "Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors", *Prenatal diagnosis*, vol. 32, no. 13, pp. 1225-1232.
- Ding, C., Chiu, R.W., Lau, T.K., Leung, T.N., Chan, L.C., Chan, A.Y., Charoenkwan, P., Ng, I.S., Law, H.Y., Ma, E.S., Xu, X., Wanapirak, C., Sanguansermisri, T., Liao, C., Ai, M.A., Chui, D.H., Cantor, C.R., Lo, Y.M. 2004, "MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 29, pp. 10762-10767.
- Efrat, Z., Perri, T., Ramati, E., Tugendreich, D., Meizner, I. 2006, "Fetal gender assignment by first-trimester ultrasound", *Ultrasound in obstetrics, gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 27, no. 6, pp. 619-621.

- Ehrich, M., Deciu, C., Zwiefelhofer, T., Tynan, J.A., Cagasan, L., Tim, R., Lu, V., McCullough, R., McCarthy, E., Nygren, A.O., Dean, J., Tang, L., Hutchison, D., Lu, T., Wang, H., Angkachatchai, V., Oeth, P., Cantor, C.R., Bombard, A., van den Boom, D. 2011, "Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 204, no. 3, pp. 205.e1-205.11.
- Evans, M.I., Henry, G.P., Miller, W.A., Bui, T.H., Snidjers, R.J., Wapner, R.J., Miny, P., Johnson, M.P., Peakman, D., Johnson, A., Nicolaides, K., Holzgreve, W., Ebrahim, S.A., Babu, R., Jackson, L. 1999, "International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 5, pp. 1213-1216.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, S.R. 2008, "Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 42, pp. 16266-16271.
- Fan, H.C., Gu, W., Wang, J., Blumenfeld, Y.J., El-Sayed, Y.Y., Quake, S.R. 2012, "Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome", *Nature*, vol. 487, no. 7407, pp. 320-324.
- Finning, K., Martin, P., Daniels, G. 2004, "A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1022, pp. 119-123.
- Finning, K., Martin, P., Summers, J., Massey, E., Poole, G., Daniels, G. 2008, "Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 336, no. 7648, pp. 816-818.
- Fiorentino, F., Napoletano, S., Caiazzo, F., Sessa, M., Bono, S., Spizzichino, L., Gordon, A., Nuccitelli, A., Rizzo, G., Baldi, M. 2013, "Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 21, no. 7, pp. 725-730.
- Firth, H.V., Boyd, P.A., Chamberlain, P., MacKenzie, I.Z., Lindenbaum, R.H., Huson, S.M. 1991, "Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation", *Lancet*, vol. 337, no. 8744, pp. 762-763.
- Fournie, G.J., Courtin, J.P., Laval, F., Chale, J.J., Pourrat, J.P., Pujazon, M.C., Lauque, D., Carles, P. 1995, "Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours", *Cancer letters*, vol. 91, no. 2, pp. 221-227.
- Friedman, J.M. 2009, "High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis", *Prenatal diagnosis*, vol. 29, no. 1, pp. 20-28.
- Galanello, R., Origa, R. 2010, "Beta-thalassemia", *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 5, pp. 11-1172-5-11.
- Gerdes, T., Kirchhoff, M., Lind, A.M., Vestergaard Larsen, G., Kjaergaard, S. 2008, "Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y", *Prenatal diagnosis*, vol. 28, no. 12, pp. 1119-1125.
- Gershman, A.J., Mehta, A.C., Infeld, M., Budev, M.M. 2006, "Cystic fibrosis in adults: an overview for the internist", *Cleveland Clinic journal of medicine*, vol. 73, no. 12, pp. 1065-1074.
- Gil, M.M., Quezada, M.S., Bregant, B., Ferraro, M., Nicolaides, K.H. 2013, "Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies", *Ultrasound*

- in obstetrics, gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 42, no. 1, pp. 34-40.
- Grati, F.R., Malvestiti, F., Ferreira, J.C., Bajaj, K., Gaetani, E., Agrati, C., Grimi, B., Dulcetti, F., Ruggeri, A.M., De Toffol, S., Maggi, F., Wapner, R., Gross, S., Simoni, G. 2014, "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results", *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, .
- Graw, J., Brackmann, H.H., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., Schwaab, R. 2005, "Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies", *Nature reviews.Genetics*, vol. 6, no. 6, pp. 488-501.
- Halicka, H.D., Bedner, E., Darzynkiewicz, Z. 2000, "Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis", *Experimental cell research*, vol. 260, no. 2, pp. 248-256.
- Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Milne, E., de Klerk, N., Bower, C. 2013, "Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis", *Human reproduction update*, vol. 19, no. 4, pp. 330-353.
- Hassold, T., Hunt, P. 2001, "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy", *Nature reviews.Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 280-291.
- Hillman, S.C., Pretlove, S., Coomarasamy, A., McMullan, D.J., Davison, E.V., Maher, E.R., Kilby, M.D. 2011, "Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis", *Ultrasound in obstetrics, gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 37, no. 1, pp. 6-14.
- Illanes, S., Denbow, M., Kailasam, C., Finning, K., Soothill, P.W. 2007, "Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma", *Early human development*, vol. 83, no. 9, pp. 563-566.
- Invernizzi, P., Biondi, M.L., Battezzati, P.M., Perego, F., Selmi, C., Cecchini, F., Podda, M., Simoni, G. 2002, "Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy", *Human genetics*, vol. 110, no. 6, pp. 587-591.
- Kitzman, J.O., Snyder, M.W., Ventura, M., Lewis, A.P., Qiu, R., Simmons, L.E., Gammill, H.S., Rubens, C.E., Santillan, D.A., Murray, J.C., Tabor, H.K., Bamshad, M.J., Eichler, E.E., Shendure, J. 2012, "Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus", *Science translational medicine*, vol. 4, no. 137, pp. 137ra76.
- Kopreski, M.S., Benko, F.A., Kwak, L.W., Gocke, C.D. 1999, "Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 5, no. 8, pp. 1961-1965.
- Koukoui, S.D., Chaudhuri, A. 2007, "Neuroanatomical, molecular genetic, and behavioral correlates of fragile X syndrome", *Brain Research Reviews*, vol. 53, no. 1, pp. 27-38.
- Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Hjelm, N.M., Lo, Y.M. 1998, "Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour", *Lancet*, vol. 352, no. 9144, pp. 1904-1905.
- Leung, T.Y., Qu, J.Z., Liao, G.J., Jiang, P., Cheng, Y.K., Chan, K.C., Chiu, R.W., Lo, Y.M. 2013, "Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing", *Prenatal diagnosis*, vol. 33, no. 7, pp. 675-681.
- Li, Y., Wenzel, F., Holzgreve, W., Hahn, S. 2006, "Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation", *Electrophoresis*, vol. 27, no. 19, pp. 3889-3896.
- Liao, G.J., Chan, K.C., Jiang, P., Sun, H., Leung, T.Y., Chiu, R.W., Lo, Y.M. 2012, "Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA", *PloS one*, vol. 7, no. 5, pp. e38154.

- Liao, G.J., Lun, F.M., Zheng, Y.W., Chan, K.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., Lo, Y.M. 2011, "Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles", *Clinical chemistry*, vol. 57, no. 1, pp. 92-101.
- Liu, F.M., Wang, X.Y., Feng, X., Wang, W., Ye, Y.X., Chen, H. 2007, "Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis", *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, vol. 86, no. 5, pp. 535-541.
- Lo, K.W., Lo, Y.M., Leung, S.F., Tsang, Y.S., Chan, L.Y., Johnson, P.J., Hjelm, N.M., Lee, J.C., Huang, D.P. 1999a, "Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma", *Clinical chemistry*, vol. 45, no. 8 Pt 1, pp. 1292-1294.
- Lo, Y.M., Chan, K.C., Sun, H., Chen, E.Z., Jiang, P., Lun, F.M., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Cantor, C.R., Chiu, R.W. 2010, "Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus", *Science translational medicine*, vol. 2, no. 61, pp. 61ra91.
- Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J.S. 1997, "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum", *Lancet*, vol. 350, no. 9076, pp. 485-487.
- Lo, Y.M., Lau, T.K., Zhang, J., Leung, T.N., Chang, A.M., Hjelm, N.M., Elmes, R.S., Bianchi, D.W. 1999b, "Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21", *Clinical chemistry*, vol. 45, no. 10, pp. 1747-1751.
- Lo, Y.M., Leung, T.N., Tein, M.S., Sargent, I.L., Zhang, J., Lau, T.K., Haines, C.J., Redman, C.W. 1999c, "Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia", *Clinical chemistry*, vol. 45, no. 2, pp. 184-188.
- Lo, Y.M., Lo, E.S., Watson, N., Noakes, L., Sargent, I.L., Thilaganathan, B., Wainscoat, J.S. 1996, "Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications", *Blood*, vol. 88, no. 11, pp. 4390-4395.
- Lo, Y.M., Lun, F.M., Chan, K.C., Tsui, N.B., Chong, K.C., Lau, T.K., Leung, T.Y., Zee, B.C., Cantor, C.R., Chiu, R.W. 2007, "Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 32, pp. 13116-13121.
- Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M., Hjelm, N.M. 1998, "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis", *American Journal of Human Genetics*, vol. 62, no. 4, pp. 768-775.
- Maebo, A. 1990, "Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer", *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai zasshi*, vol. 28, no. 8, pp. 1085-1091.
- Mandel, P., Metais, P. 1948, "Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme", *C. R. Acad. Sci.*, vol. 142, pp. 241-243.
- Mann, K., Hills, A., Donaghue, C., Thomas, H., Ogilvie, C.M. 2012, "Quantitative fluorescence PCR analysis of >40,000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X", *Prenatal diagnosis*, vol. 32, no. 12, pp. 1197-1204.
- Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N.B. 2005, "Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study", *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, vol. 7, no. 4, pp. 251-263.
- Nepomnyashchaya, Y.N., Artemov, A.V., Roumiantsev, S.A., Roumyantsev, A.G., Zhavoronkov, A. 2013, "Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations", *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, vol. 51, no. 6, pp. 1141-1154.

- Nicolaides, K.H., Syngelaki, A., Ashoor, G., Birdir, C., Touzet, G. 2012, "Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 207, no. 5, pp. 374.e1-374.e6.
- Nigam, A., Saxena, P., Prakash, A., Acharya, A. 2012, "Detection of fetal nucleic acid in maternal plasma: A novel noninvasive prenatal diagnostic technique", *JIMSA*, no. 25, pp. 119-200.
- Norton, M.E., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., Laurent, L.C., Caughey, A.B., Rodriguez, M.H., Williams, J., 3rd, Mitchell, M.E., Adair, C.D., Lee, H., Jacobsson, B., Tomlinson, M.W., Oepkes, D., Holleman, D., Sparks, A.B., Oliphant, A., Song, K. 2012, "Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 207, no. 2, pp. 137.e1-137.e8.
- Odibo, A.O., Lawrence-Cleary, K., Macones, G.A. 2003, "Screening for aneuploidy in twins and higher-order multiples: is first-trimester nuchal translucency the solution?", *Obstetrical, gynecological survey*, vol. 58, no. 9, pp. 609-614.
- Ohashi, Y., Miharu, N., Honda, H., Samura, O., Ohama, K. 2002, "Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum", *Clinical chemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 386-388.
- Page-Christiaens, G.C., Bossers, B., VAN DER Schoot, C.E., DE Haas, M. 2006, "Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1075, pp. 123-129.
- Palomaki, G.E., Deciu, C., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Neveux, L.M., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Grody, W.W., Nelson, S.F., Canick, J.A. 2012, "DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study", *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, vol. 14, no. 3, pp. 296-305.
- Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Neveux, L.M., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Deciu, C., Grody, W.W., Nelson, S.F., Canick, J.A. 2011, "DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study", *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, vol. 13, no. 11, pp. 913-920.
- Petek, E., Pertl, B., Tschernigg, M., Bauer, M., Mayr, J., Wagner, K., Kroisel, P.M. 2003, "Characterisation of a 19-year-old "long-term survivor" with Edwards syndrome", *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)*, vol. 14, no. 2, pp. 239-244.
- Petersen, M.B., Mikkelsen, M. 2000, "Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms", *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 91, no. 1-4, pp. 199-203.
- Poon, L.L., Leung, T.N., Lau, T.K., Chow, K.C., Lo, Y.M. 2002, "Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma", *Clinical chemistry*, vol. 48, no. 1, pp. 35-41.
- Poon, L.L., Leung, T.N., Lau, T.K., Lo, Y.M. 2000, "Presence of fetal RNA in maternal plasma", *Clinical chemistry*, vol. 46, no. 11, pp. 1832-1834.
- Proffitt, A. 2012, "Natera's Prenatal Secret Sauce", *Bio IT World*, vol. Bonus Edition:Non-Invasive Prenatal Testing, pp. 9-10.
- Qu, J.Z., Leung, T.Y., Jiang, P., Liao, G.J., Cheng, Y.K., Sun, H., Chiu, R.W., Chan, K.C., Lo, Y.M. 2013, "Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis", *Clinical chemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 427-435.
- RCOG (2010). Amniocentesis and chorionic villus sampling (Green-top 8). no 8, RCOG Press, London 1-13.
- Rogers, J.C., Boldt, D., Kornfeld, S., Skinner, A., Valeri, C.R. 1972, "Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen",

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, no. 7, pp. 1685-1689.
- Rudin, C.M., Thompson, C.B. 1997, "Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death", *Annual Review of Medicine*, vol. 48, pp. 267-281.
- Scheffer, P.G., van der Schoot, C.E., Page-Christiaens, G.C., de Haas, M. 2011, "Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience", *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 118, no. 11, pp. 1340-1348.
- Sekizawa, A., Sugito, Y., Iwasaki, M., Watanabe, A., Jimbo, M., Hoshi, S., Saito, H., Okai, T. 2001, "Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum", *Clinical chemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 2164-2165.
- Song, Y., Liu, C., Qi, H., Zhang, Y., Bian, X., Liu, J. 2013, "Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population", *Prenatal diagnosis*, vol. 33, no. 7, pp. 700-706.
- Sorenson, G.D., Porter, D.M., Barth, R.J., Memoli, V.A., Rhodes, C.H., Karagas, M., Tosteson, T.D., Bzik, D.J. 1997, "Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the CA19-9 assay.", *Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.*, vol. 18, pp. 66.
- Sparks, A.B., Struble, C.A., Wang, E.T., Song, K., Oliphant, A. 2012a, "Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 206, no. 4, pp. 319.e1-319.e9.
- Sparks, A.B., Wang, E.T., Struble, C.A., Barrett, W., Stokowski, R., McBride, C., Zahn, J., Lee, K., Shen, N., Doshi, J., Sun, M., Garrison, J., Sandler, J., Hollemon, D., Pattee, P., Tomita-Mitchell, A., Mitchell, M., Stuelpnagel, J., Song, K., Oliphant, A. 2012b, "Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy", *Prenatal diagnosis*, vol. 32, no. 1, pp. 3-9.
- Spencer, K. 2000, "Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free beta-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness", *Prenatal diagnosis*, vol. 20, no. 2, pp. 91-95.
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Maurice, P.A. 1987, "Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients", *European journal of cancer, clinical oncology*, vol. 23, no. 6, pp. 707-712.
- Sturrock, A., Leavitt, B.R. 2010, "The clinical and genetic features of Huntington disease", *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, vol. 23, no. 4, pp. 243-259.
- Szczepura, A., Osipenko, L., Freeman, K. 2011, "A new fetal RHD genotyping test: Costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales", *BMC Pregnancy Childbirth*, no. 11, pp. 5.
- Tabor, A., Vestergaard, C.H., Lidegaard, O. 2009, "Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study", *Ultrasound in obstetrics, gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 34, no. 1, pp. 19-24.
- Tsui, N.B., Jiang, P., Wong, Y.F., Leung, T.Y., Chan, K.C., Chiu, R.W., Sun, H., Lo, Y.M. 2014, "Maternal Plasma RNA Sequencing for Genomewide Transcriptomic Profiling and Identification of Pregnancy-Associated Transcripts", *Clinical chemistry*, .
- Van der Schoot, C.E., Soussan, A.A., Koelewijn, J., Bonsel, G., Paget-Christiaens, L.G., de Haas, M. 2006, "Non-invasive antenatal RHD typing", *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, vol. 13, no. 1-2, pp. 53-57.
- Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., Oliphant, A. 2013, "Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma", *Prenatal diagnosis*, vol. 33, no. 7, pp. 662-666.

- Wapner, R.J., Martin, C.L., Levy, B., Ballif, B.C., Eng, C.M., Zachary, J.M., Savage, M., Platt, L.D., Saltzman, D., Grobman, W.A., Klugman, S., Scholl, T., Simpson, J.L., McCall, K., Aggarwal, V.S., Bunke, B., Nahum, O., Patel, A., Lamb, A.N., Thom, E.A., Beaudet, A.L., Ledbetter, D.H., Shaffer, L.G., Jackson, L. 2012, "Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis", *The New England journal of medicine*, vol. 367, no. 23, pp. 2175-2184.
- World Health Organization 2011, *WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia and Eclampsia*.
- Wu, J., Springett, A., Morris, J.K. 2013, "Survival of trisomy 18 (Edwards syndrome) and trisomy 13 (Patau Syndrome) in England and Wales: 2004-2011", *American journal of medical genetics.Part A*, vol. 161, no. 10, pp. 2512-2518.
- Wu, T.L., Zhang, D., Chia, J.H., Tsao, K.-., Sun, C.F., Wu, J.T. 2002, "Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range", *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 321, no. 1-2, pp. 77-87.
- Yu, S.C., Lee, S.W., Jiang, P., Leung, T.Y., Chan, K.C., Chiu, R.W., Lo, Y.M. 2013, "High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing", *Clinical chemistry*, vol. 59, no. 8, pp. 1228-1237.
- Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Li, J.C., Aydinli, K., Hahn, S. 2000, "High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report", *Prenatal diagnosis*, vol. 20, no. 10, pp. 838-841.
- Zhong, X.Y., Laivuori, H., Livingston, J.C., Ylikorkala, O., Sibai, B.M., Holzgreve, W., Hahn, S. 2001, "Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 184, no. 3, pp. 414-419.
- Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., Baner, J., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Chopra, N., Dodd, M., Levy, B., Rabinowitz, M. 2012, "Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci", *Prenatal diagnosis*, vol. 32, no. 13, pp. 1233-1241.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.ultraheli.ee/ultraheliaparaat>

<http://library.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/PRENATAL/PRENATAL.html>

<http://www.kliinikum.ee/medgen/>

<http://www.kliinikum.ee/naistekliinik/>

<http://www.itk.ee/kliinikud/naistekliinik>

<https://www.riigiteataja.ee/akt/123022013001>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kelli Grand

(sünnikuupäev: 18.10.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Loote DNA sekveneermine – uus ajastu sünnieelses diagnostikas.
mille juhendaja on Lili Milani, Ph.D

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014